

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA PRÉÉCLAMPSIE SUR LE TRANSPORT DE
CALCIUM TRANSPLACENTAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

SOPHIE HACHÉ

DÉCEMBRE 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide de certaines personnes. Grâce à elles, ma maîtrise fût une expérience mémorable. J'aimerais profondément remercier :

Docteure Julie Lafond, qui a eu confiance en moi et m'a soutenue tout au long de ma maîtrise,

Frédérique Le Bellego, qui m'a gentiment transmis ses connaissances et qui a su me démontrer les bonnes marches à suivre,

Maude Éthier-Chiasson Ouellet, qui a su répondre à toutes mes questions et sans qui cette expérience n'aurait pas été si agréable.

Merci aux membres de la belle équipe du centre de recherche Biomed, qui ont, de près ou de loin, participé à ce projet.

Un énorme merci à tous ceux que j'aime. Sans ma famille et mes amis, je n'aurais pu me rendre jusqu'ici... MERCI !

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----|
| LISTE DES FIGURES | v |
| LISTE DES TABLEAUX | vi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | vii |
| RÉSUMÉ | x |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. CHAPITRE I : ÉTATS DES CONNAISSANCES | 4 |
| 1.1 Le placenta : organe essentiel | 4 |
| 1.1.1 Rôles généraux | 4 |
| 1.1.2 Formation placentaire | 4 |
| 1.2 La prééclampsie | 8 |
| 1.2.1 Lésions placentaires | 8 |
| 1.2.2 Diagnostic | 10 |
| 1.2.3 Prévention et traitements | 15 |
| 1.3 Rôle du placenta dans la prééclampsie | 17 |
| 1.3.1 Stress oxydatif dans le placenta | 18 |
| 1.3.2 Conclusions | 21 |
| 1.4 Le calcium | 21 |
| 1.4.1 Régulation hormonale | 22 |
| 1.5 Les transporteurs calciques | 24 |
| 1.5.1 Transport de calcium transplacentaire | 25 |
| 1.5.2 Homéostasie calcique intracellulaire | 29 |
| 1.6 Hypothèses de travail | 32 |
| 2. CHAPITRE II : ARTICLE SCIENTIFIQUE | 33 |
| 2.1 CONTRIBUTIONS | 33 |
| 2.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE: | 34 |
| Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblast: Effect on calcium exchange in placenta. | |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.2.1 | ABSTRACT | 35 |
| 2.2.2 | INTRODUCTION | 36 |
| 2.2.3 | MATERIALS AND METHODS | 39 |
| 2.2.4 | RESULTS | 44 |
| 2.2.5 | DISCUSSION | 48 |
| 2.2.6 | ACKNOWLEDGEMENTS | 53 |
| 2.2.7 | REFERENCES | 54 |
| 2.2.8 | TABLES | 58 |
| 2.2.9 | FIGURE LEGENDS | 61 |
| 2.2.10 | FIGURES | 64 |
| 3. | CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSIONS | 74 |
| 4. | CHAPITRE IV : BIBLIOGRAPHIE | 78 |
| 5. | APPENDICE A | 91 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|------|
| Figure 1.1 Schématisation des principales interfaces fœto-maternelles pendant la grossesse. Tiré de Le Bouteillier et Tabiasco, 2006..... | p.5 |
| Figure 1.2 Schématisation de l'invasion trophoblastique et du remodelage des artères spiralées lors d'une grossesse PE comparativement à une grossesse normale. Image modifiée, tirée de Moffett-King, 2002 | p.9 |
| Figure 1.3 Schématisation du syncytiotrophoblaste humain et de ses protéines associées, impliquées dans le transport de Ca^{2+} transplacentaire. Image tirée de Lafond et Simoneau, 2006..... | p.28 |
| Figure 1.4 Schématisation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Image modifiée, tirée du site internet «Cell Biology, Chapter 6 Cell Signaling » http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail6.htm | p.31 |
| Figure 2.1 The calcium transport decreased in trophoblasts coming from PE placentas..... | p.64 |
| Figure 2.2 Protein and mRNA expression of calcium channels TRPV5 and TRPV6 in placentas coming from normal women compared to women with PE..... | p.65 |
| Figure 2.3 Protein and mRNA expression of CaBP-9K and -28K in placentas coming from healthy women compared to women with PE..... | p.66 |
| Figure 2.4 Protein and mRNA expression of calcium pumps (PMCA) isoforms 1 and 4 in normal and PE placentas..... | p.67 |
| Figure 2.5 mRNA expression of the ATP synthase gene in normal and PE placentas..... | p.68 |
| Figure 2.6 mRNA expression of 3 isoforms of the IP3R gene in normal and PE placentas..... | p.69 |
| Figure 2.7 mRNA expression of 3 isoforms of the RyR gene in normal and PE placentas..... | p.70 |
| Figure 2.8 mRNA expression of 3 isoforms of the SERCA gene in normal and PE placentas..... | p.71 |
| Figure 2.9 mRNA expression of 3 isoforms of the VDAC gene in normal and PE placentas..... | p.72 |
| Figure 2.10 mRNA expression of the hOGG1 gene in normal and PE placentas..... | p.73 |

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Facteurs de risque reliés à la PE.....p.11

Table 2.1 Clinical characteristics of mothers and babies.....p.58

Table 2.2 Real-Time PCR primer sequences.....p.59

Table 2.3 Antibodies information.....p.60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---------------|---|
| $[Ca^{2+}]_i$ | Concentration de calcium intracellulaire |
| μg | Microgramme |
| μM | Micro molaire |
| $^{45}CaCl_2$ | Isotope 45 de calcium |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| ANGI | Angiotensine I |
| ANGII | Angiotensine II |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BCA | Acide bicinchonique |
| BSA | Sérum d'albumine bovine |
| Ca^{2+} | Calcium |
| CaBP | « Calcium binding protein » (protéine de liaison du calcium) |
| $CaCl_2$ | Chlorure de calcium |
| cDNA | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| CTEV | Cytotrophoblaste extravilleux |
| CTV | Cytotrophoblaste villeux |
| DMEM-HG | « Dulbecco's modified Eagle's medium - high glucose » |
| ELISA | « Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay » (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) |
| FCS | « Fetal calf serum » (sérum de veau fœtal) |
| g | Gramme |
| h | Heure |
| hCG | Hormone gonadotrophine chorionique humaine |
| HCL | Acide chlorhydrique |
| hCS | Hormone chorionique somatoamniotrophique humaine |
| HELLP | « haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count » (anémie hémolytique, cytolysé hépatique et thrombopénie) |
| Hg | Mercure |
| hOGG1 | « Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1 » |
| hPL | Hormone lactogène placentaire humain |
| HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 |

| | |
|--------------------|--|
| IMC | Indice de masse corporelle (en kg/m ²) |
| IP3 | Inositol 1-4,5-triphosphate |
| IP3R | Récepteur de l'inositol 1-4,5-triphosphate |
| kg | Kilogramme |
| mg | Milligramme |
| Mg ²⁺ | Magnésium |
| MgSO ₄ | Magnésium sulfate |
| mm | Millimètre |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NaOH | Hydroxyde de sodium |
| NCX | Échangeur sodium/calcium |
| NH ₄ Cl | Chlorure d'ammonium |
| NK | Cellule tueuse (« Natural killer cells ») |
| nM | nanomolaire |
| O ₂ | Dioxygène |
| PCR | « Polymerase chain reaction » (réaction en chaîne de polymérase) |
| PE | Prééclampsie |
| PGH | Hormone de croissance placentaire |
| pH | Potentiel hydrogène |
| PLC | Phospholipase C |
| PMCA | « Plasma membrane calcium ATPase » (pompes calciques de la membrane plasmique) |
| PSN | Pénicilline-streptomycine-néomycine |
| PTH | Parathormone |
| PTHrP | « Parathyroid-hormone-related protein » (protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne) |
| PVDF | « Polyvinylidene difluoride » (polyfluorure de vinylidène) |
| RAS | Système rénine-angiotensine |
| RCIU | Restriction de croissance intra-utérine |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| ROS | Espèces réactives d'oxygène |
| RT-PCR | « Reverse transcriptase PCR » (Réaction en chaîne de polymérase par transcription inverse) |
| RyR | Récepteur ryanodine |
| S.E.M | Erreur standard de la moyenne |

| | |
|----------|--|
| SDS-PAGE | « Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis » (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) |
| SERCA | Réticulums sarco-endoplasmiques ATPase |
| SGA | « Small for gestational age » (petit pour l'âge gestationnel) |
| SO | Stress oxydatif |
| ST | Syncytiotrophoblaste |
| TBS-T | « Tris-buffered saline / Twin 20 » (solution de tampon saline Tris et de Twin 20) |
| TRPV | « Transient receptor potential vanilloid » (récepteurs transitoires de potentiels de type vanilloïde) |
| VDAC | Canal à anions voltage-dépendant |
| V_i | Vélocité initiale |

RÉSUMÉ

La prééclampsie (PE), principale cause de décès maternel, est une pathologie gravidique touchant $\approx 8\%$ des grossesses. Bien que l'étiologie de cette maladie soit inconnue, certaines études cliniques ont suggéré une altération du métabolisme de calcium (Ca^{2+}) en présence de PE. Suivant l'hypothèse que les échanges de Ca^{2+} par les syncytiotrophoblastes sont perturbés lors de grossesses PE, notre objectif est d'approfondir les mécanismes de transport du Ca^{2+} dans les placentas PE en comparant, avec des placentas normaux, l'expression de différentes protéines impliquées dans l'homéostasie calcique. À partir de tissus placentaires totaux, nous avons étudié l'expression de ces protéines ainsi que l'influence des variations d'expression observés sur le transport de Ca^{2+} dans des cultures primaires de syncytiotrophoblastes. Les niveaux d'ARNm et de protéine ont été examinés par PCR en temps réel et par Western Blot, respectivement, chez un groupe normal ($n=16$) et un groupe PE ($n=8$). Notre étude a démontré une diminution significative du transport de Ca^{2+} par les syncytiotrophoblastes primaires PE ainsi qu'une diminution de l'expression protéique et d'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans le transfert de Ca^{2+} dans les placentas PE, accompagné d'une augmentation de l'expression d'un marqueur de stress oxydatif (hOGG1) ainsi qu'une diminution d'une enzyme synthétisant l'ATP (ATP synthétase). Aussi, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique semblent augmenter leurs réserves de Ca^{2+} lors de PE. De plus, comme plusieurs hormones sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie du Ca^{2+} , nous avons voulu approfondir nos recherches à ce sujet. Nous avons observé que l'expression de plusieurs récepteurs impliqués dans cette régulation était diminuée dans les placentas PE, notamment le récepteur de la progestérone, de l'œstradiol, de la vitamine D et de la PHTrP. Nous concluons donc que l'homéostasie du Ca^{2+} et son transport à travers le placenta sont compromis lors de grossesses prééclampsiques et cela semble être affecté par un manque d'ATP et un excès de stress oxydatif. Des recherches futures seront nécessaires afin de mieux comprendre l'implication de la régulation hormonale sur le transfert de Ca^{2+} lors de PE.

MOTS CLÉS : Prééclampsie, calcium, placenta, trophoblaste, syncytiotrophoblaste, stress oxydatif.

INTRODUCTION

La grossesse est un évènement très important dans la vie d'une femme mais malheureusement, elle n'est pas toujours sans complication. Effectivement, il est relativement fréquent que la santé de la mère et/ou du fœtus soit compromise lors de la grossesse. La prééclampsie (PE) est une pathologie gravidique, c'est-à-dire qu'elle peut survenir seulement lors de la grossesse. Elle est présente lorsqu'une femme enceinte atteinte d'hypertension se met à développer une protéinurie, caractérisée par un excès de protéines dans l'urine, et de l'œdème. Entre 7 et 10 % des femmes enceintes souffrent de PE et cette maladie provoque chaque année près de 40 000 décès dans le monde (Lopez-Jaramillo, Casas et Serrano, 2001). Une des causes potentielles de la PE serait une perturbation dans le développement du placenta, caractérisée par une défectuosité de l'invasion des trophoblastes, ce qui engendrerait une implantation précaire du placenta dans l'utérus (Newhouse *et al.*, 2007). En effet, le débit sanguin utero-placentaire est réduit de plus de 50% chez les femmes souffrant de PE (Murphy *et al.*, 2006) et conséquemment, l'approvisionnement de nutriments au fœtus en développement est altéré. Or, la PE est souvent associée à la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), caractérisée par la croissance anormalement lente du fœtus (Heazell et Crocker, 2008).

En plus de l'endomètre (muqueuse utérine aussi appelée decidua lors de la grossesse), les cellules du placenta (les trophoblastes) régulent les échanges de nutriments, de facteurs de croissance, d'oxygène (O_2) et de déchets entre la mère et le fœtus. Malheureusement, l'origine de la PE est encore inconnue, mais une relation avec le calcium (Ca^{2+}) a clairement été établie. En effet, des études épidémiologiques et cliniques ont démontré des changements dans le métabolisme du Ca^{2+} chez la femme souffrant de PE (Lafond et Simoneau, 2006). Il a aussi été démontré qu'une alimentation supplémentée en Ca^{2+} pouvait atténuer les symptômes provoqués par la pathologie, sans tout de même engendrer un rétablissement total de la mère ou du fœtus (Bergel et Barros, 2007; Ohara, 2001).

Il est connu que la parathormone (PTH) et la forme biologiquement active de la vitamine D ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) sont les principales hormones contrôlant l'homéostasie calcique (Nijenhuis T., 2005). La protéine apparentée à la PTH (PTHrP) est produite physiologiquement par plusieurs tissus maternels et fœtaux, plus particulièrement par le placenta lors de la grossesse. Notons ici que la PTHrP stimule le transfert de Ca^{2+} au travers du placenta (Curtis *et al.*, 1998), alors que la PTH ne semble avoir aucun effet sur le transport de Ca^{2+} transplacentaire (Kovacs *et al.*, 1996). Halhali *et al.* suggèrent que les altérations du transfert calcique dans la PE pourraient être reliées à une production inadéquate de la PTHrP (Halhali *et al.*, 2007) alors qu'une carence en vitamine D a été reliée à plusieurs complications de grossesse, incluant celles associées avec l'insuffisance placentaire, incluant la PE (Bodnar *et al.*, 2007; Seely, 2007). De plus, il a été démontré que le stress oxydatif (SO) observé chez les femmes atteintes de PE pouvait induire une réduction importante de l'activité des pompes calciques de la membrane plasmique (PMCA), responsables de l'expulsion du Ca^{2+} du placenta (Carrera *et al.*, 2003). Malheureusement, il existe peu d'études sur le transport du Ca^{2+} placentaire lors de PE.

Bien que les mammifères possèdent un type de placenta partageant une fonction commune dans la modulation des échanges à l'interface materno-fœtale, il est clair que le placenta humain possède une structure et des fonctions uniques (Carter, 2007). De plus, en raison de la variabilité du placenta humain, les modèles animaux ne sont pas appropriés pour l'étude de ses procédés complexes. Plusieurs études utilisent l'isolement des trophoblastes villosités pour étudier la différenciation villositaire. En effet, en présence de sérum de veau fœtal (FCS), les cellules mononucléées cytotrophoblastiques, purifiées au premier trimestre et à terme, migrent et fusionnent pour former un syncytiotrophoblaste (ST) démontrant une production hormonale spécifique à la grossesse, entre autres la production d'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG), d'hormone chorionique somatoamniotrophique humaine (hCS), et d'œstrogènes. Ceci résume les activités importantes accomplies par les cellules cytotrophoblastiques *in vivo* durant la maturation (Malassine et Cronier, 2002). Ainsi, puisque le modèle animal représente une limite à l'entière compréhension des pathologies humaines complexes

comme la PE (Carter, 2007), nous avons choisi de faire nos expérimentations sur le placenta humain, étant critique pour la bonne compréhension de ses fonctions uniques et de son rôle potentiel dans le développement de maladies.

Ce projet a eu pour but d'accroître les connaissances sur le transport placentaire du Ca^{2+} entre la mère et le fœtus chez les grossesses affectées par la PE en comparaison avec les grossesses normales. Plus précisément, nos objectifs sont 1) de caractériser les mécanismes calciques qui pourraient être altérés dans les grossesses avec PE en étudiant l'expression génique des protéines impliquées dans le transfert du Ca^{2+} vers le fœtus, 2) de caractériser les mécanismes impliqués dans l'homéostasie de Ca^{2+} intracellulaire lors de PE, et 3) de déterminer les relations entre la modulation de l'expression génique des protéines responsables du transport de Ca^{2+} transplacentaire, de l'homéostasie calcique intracellulaire, de la régulation hormonale et du SO dans le tissu placentaire. Ce projet est une des rares études tentant d'élucider les mécanismes de transfert de Ca^{2+} dans le placenta en présence de PE, prenant en compte les transporteurs calciques, les principales hormones impliquées en plus du rôle du SO.

Afin de bien vous informer sur cette problématique d'envergure, vous trouverez dans ce mémoire une revue de la littérature pertinente incluant diverses découvertes récentes au sujet de l'homéostasie calcique dans le placenta humain et de la PE, suivi d'un article scientifique, publié dans le « Journal of Cellular and Molecular Medicine », comportant les principaux résultats obtenus lors de cette étude et finalement, une conclusion complémentaire à l'article présenté, faisant le bilan général des résultats obtenus et discutant brièvement des résultats supplémentaires présentés à l'appendice A.

CHAPITRE I.

ÉTATS DES CONNAISSANCES

1.1 Le placenta : organe essentiel

1.1.1 Rôles généraux

Le placenta est un organe transitoire indispensable retrouvé chez les mammifères, représentant une connexion physique et biologique entre la mère et le fœtus durant la grossesse. De plus, il représente l'organe le plus varié des mammifères, tant en structure qu'en fonction. En effet, en plus de posséder deux systèmes circulatoires différents (maternel et fœtal), le placenta assure la protection, la croissance et le développement du fœtus, entre autres par la régulation des échanges gazeux, l'excrétion, la balance osmotique et la régulation du pH. Notons aussi qu'il synthétise et sécrète plusieurs hormones, dirige la formation de la moelle osseuse et joue un rôle immunologique essentiel (Malassine et Cronier, 2002). Le développement du placenta est en constante évolution puisqu'il se perpétue tout au long de la grossesse afin de s'adapter aux besoins métaboliques de l'embryon en croissance (Moffett-King, 2002).

1.1.2 Formation placentaire

D'origine fœtale, le tissu placentaire se joint partiellement avec l'endomètre et se dit « fœto-maternel ». En général, la partie fœtale se nomme chorion, tandis que la partie maternelle est désignée par le terme *decidua*. La formation du placenta est essentielle pour le développement de l'embryon. C'est pourquoi elle est entamée aussitôt que les membranes fœtales établissent un contact stable avec la muqueuse utérine maternelle. Effectivement, le blastocyste (embryon précoce) contient une masse cellulaire interne, à l'origine de l'embryon

(embryoblaste), et une masse cellulaire externe constituant la première source des membranes du placenta (trophoblaste). Environ 7 à 8 jours après la conception, le blastocyste envahit l'utérus et la formation du placenta résulte d'une série d'interactions complexes entre les cellules trophoblastiques fœtales et maternelles dans la caduque de l'utérus. Ce processus implique la prolifération, l'invasion, et la différenciation des cellules trophoblastiques extra-embryonnaires, qui sont des cellules souches à partir desquelles les différentes populations de trophoblastes sont dérivées. En effet, avec la progression de la placentation, deux voies de différenciation mènent à la formation de deux populations de cytotrophoblastes distinctes, le cytotrophoblaste villositaire (CTV) et le cytotrophoblaste extravillous (CTEV) (Benirschke, 2000). Voir figure 1.1.

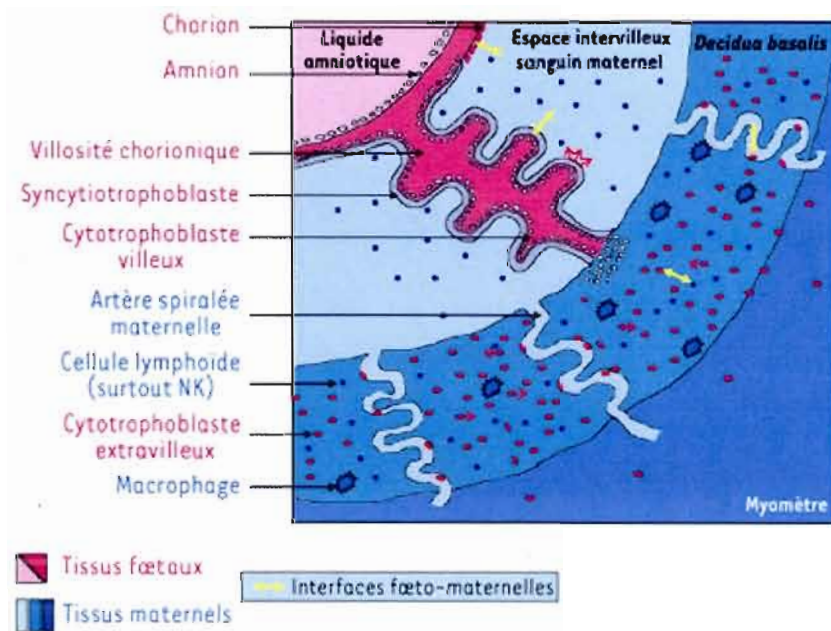


Figure 1.1 Schématisation des principales interfaces fœto-maternelles pendant la grossesse. Tiré de Le Bouteillier et Tabiasco, 2006 (Le Bouteillier et Tabiasco, 2006).

Le CTV reste attaché à la membrane basale des villosités chorioniques, formant une monocouche de cellules épithéliales qui prolifèrent et se différencient en fusionnant pour former un ST couvrant toute la surface de la villosité. Le ST est très invasif à ce stade, grâce à son activité protéolytique, et pénètre l'épithélium utérin pour envahir l'endomètre (Evain-Brion, 2001). Le ST peut se décrire comme une masse protoplasmique multinucléée dont la croissance est équilibrée entre son renouvellement (fusion des CTV) et l'apoptose du syncytium tout au long de la grossesse. Le ST est habituellement formé au 8^e jour de la grossesse. Il induit l'apoptose des cellules de la muqueuse utérine et crée une ouverture par laquelle le blastocyste pénètre dans l'endomètre. Par la suite, le ST digère graduellement la paroi des capillaires de l'endomètre, ce qui permet au sang maternel de se déverser dans les cavités du ST (Cheng et Wang, 2009). La circulation fœto-placentaire commence à être efficace lorsque les vaisseaux de l'embryon communiquent avec le placenta, c'est-à-dire vers la troisième semaine de grossesse (Lyall, 2006). L'épithélium trophoblastique (les cytotrophoblastes et le ST) entoure les tissus conjonctifs, incluant les vaisseaux sanguins fœtaux, les fibroblastes et les macrophages. Le CTV est la barrière fonctionnelle entre le sang maternel et stroma fœtal. Ainsi, le ST est impliqué dans l'absorption, les échanges et les fonctions spécifiques du système endocrinien. Il est capable de sécréter des hormones stéroïdes (les œstrogènes et la progestérone), des hormones polypeptidiques (hCG, hPL (hormone lactogène placentaire humaine), PGH (hormone de croissance placentaire)) en plus de nombreux facteurs de croissance, cytokines et neuropeptides impliqués dans la croissance fœto-placentaire (Evain-Brion, 2001). La compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation du CTV en ST s'est beaucoup améliorée depuis que nous avons la possibilité d'isoler, de purifier et de maintenir ces cellules en cultures primaires (Kliman *et al.*, 1986). Les cultures primaires de cytotrophoblastes, isolés de placentas humains à terme, fusionnent généralement à partir du 2^e jour de culture (Vargas *et al.*, 2008), se différenciant spontanément en ST et agissant de façon semblable au syncytium *in vivo* (Kliman *et al.*, 1986). Lors d'une expérience antérieure, notre équipe a étudié la différenciation des cytotrophoblastes *in vitro* en ST fonctionnel en mesurant, pour une période de 7 jours, la sécrétion d'hCG, un marqueur bien connu de la fusion des cytotrophoblastes (Kliman *et al.*, 1986). Nous avons alors observé une sécrétion maximale d'hCG en parallèle à un transport de Ca⁺² optimal au 4^e jour de culture (Moreau *et al.*, 2002).

En ce qui a trait au phénotype extravilleux, les cellules cytotrophoblastiques des villosités d'ancrage prolifèrent, se détachent de la membrane basale, et s'agrègent afin de former des colonnes de cellules pour se fixer à la paroi utérine. De là, des cellules individuelles migrent dans la caduque et le myomètre, remodelant l'endomètre et son système vasculaire. Ainsi, certains CTEV envahissent les artérioles utérines, détruisent le médium et remplacent les cellules endothéliales, créant de nouveaux vaisseaux sanguins de grand taille et à faible résistance (Evain-Brion, 2001). L'invasion trophoblastique endovasculaire est d'une importance majeure pour la physiologie foeto-placentaire. En effet, durant le premier trimestre de la grossesse, des amas de cytotrophoblastes bloquent les petites artères qui alimentent le site placentaire, afin de protéger le fœtus d'une exposition à des niveaux d'O₂ trop élevés durant cette phase critique du développement (Evain-Brion, 2001). Comme dans les modèles de tumeur, le stimulus pour l'invasion et l'angiogénèse est l'hypoxie. Parallèlement, il a été démontré que durant les stages précoces de la grossesse, le placenta humain développait un environnement physiologiquement faible en O₂. Dans cet environnement hypoxique, les trophoblastes doivent envahir l'endomètre jusqu'à la jonction deciduo-myéométriale dans le but d'atteindre les artères pour trouver l'O₂ dont ils ont besoin. De plus, cela favorise l'angiogénèse, qui permettra d'atteindre un niveau d'O₂ assez élevé pour alimenter les tissus environnants (Genbacev *et al.*, 1997; Tranquilli et Landi). Finalement, la structure placentaire humaine se dit hémomonochoriale puisque le sang maternel est en contact direct avec le sang fœtal via le ST. Ce dernier est donc le siège des transferts de nutriments de la mère au fœtus (Leiser et Kaufmann, 1994). L'apport nutritif du fœtus, essentiel à sa survie, est assuré par la mère. Les électrolytes suivent les mouvements de l'eau, tandis que le fer et le Ca²⁺ ne vont que dans le sens mère-enfant.

Décidément, la placentation est un phénomène très complexe, de plus que les restrictions éthiques ont pendant longtemps ralenti les études à ce sujet. Aujourd'hui, nous en savons plus sur ce phénomène caractérisé d'interactions successives finement synchronisées entre deux tissus d'origine génétique distincte, le trophoblaste et l'endomètre maternel, bien qu'il reste encore beaucoup de chose à découvrir à ce sujet.

1.2 La prééclampsie

La PE est une pathologie gravidique touchant de 7 à 10% des grossesses et affectant la santé de la mère et/ou du fœtus. Plus précisément, la PE se caractérise par de l'hypertension, de l'œdème et de la protéinurie (présence de protéines dans l'urine) chez la mère et souvent par de l'hypocalcémie et un retard de croissance chez le fœtus. Il arrive que la PE s'aggrave, causant entre autres l'éclampsie (complication grave de la grossesse caractérisée par des convulsions), une insuffisance rénale aigue et peut même causer la mort de la mère et/ou du fœtus. Malheureusement, les causes de la PE sont encore inconnues mais une relation avec le Ca^{2+} a clairement été établie (Lafond et Simoneau, 2006). De plus, il est clair que la présence du placenta joue un rôle central dans la pathophysiologie de la PE (Huppertz, 2008). En effet, la PE ne survient que chez les femmes enceintes mais peut se développer lors de grossesses molaires (sans fœtus) ou lors de grossesses abdominales (sans utérus); le seul remède efficace connu étant l'accouchement (Redman, 1991).

1.2.1 Lésions placentaires

La PE survient généralement après le deuxième trimestre de la grossesse, ce qui correspond au moment de l'établissement de la circulation hémochoriale (Cross, Werb et Fisher, 1994). L'interface fœto-maternelle est composé du CTV, se situant du côté fœtal et recouvrant l'ensemble des villosités placentaires permettant les échanges, et du CTEV, se situant dans la decidua maternelle et pénétrant le tissu conjonctif de l'endomètre puis du myomètre, et dont une partie remonte la paroi des artères spiralées afin d'induire des remaniements vasculaires les transformant en artères utéro-placentaires de large calibre. Ces artères sont non contractiles, très détendues et modulent l'établissement d'une circulation vers l'espace intervillieux (Strickland et Richards, 1992). Il est évident que ces procédés doivent être parfaitement régulés afin d'assurer des échanges efficaces entre la mère et son fœtus. Il est connu qu'une invasion insuffisante du trophoblaste dans les artères spiralées maternelles contribue au développement de la PE. En temps normal, les vaisseaux sanguins du placenta subissent des changements physiologiques incluant la perte de la tunique endothéliale interne et de la plupart de la tunique musculaire des artères spiralées, accompagné d'une augmentation remarquable du calibre de ces vaisseaux (Brosens, Robertson et Dixon, 1967).

Ces changements sont essentiels afin de pouvoir répondre à une future augmentation de la demande du débit sanguin causée par la présence du fœtus (Zhou *et al.*, 1993). En présence de PE, les cellules du trophoblaste infiltrant le site d'implantation sont moins nombreuses, ne pénètrent pas les couches profondes de la decidua ni les couches du myomètre et les modulations physiologiques touchant les artères spiralées sont très réduites, voire même absentes (de Groot, O'Brien et Taylor, 1996; Zhou *et al.*, 1993) (*Voir figure 1.2*).

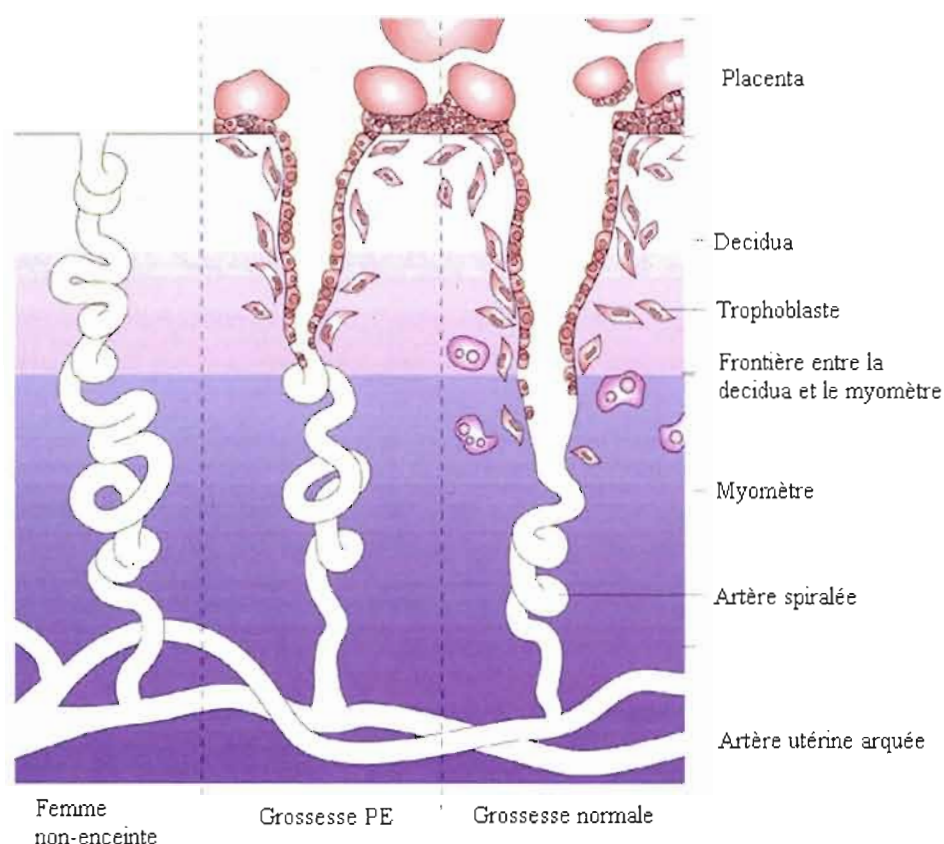


Figure 1.2 Schématisation de l'invasion trophoblastique et du remodelage des artères spiralées lors d'une grossesse PE comparativement à une grossesse normale. Image modifiée, tirée de Moffett-King, 2002.

En présence de PE, les artères utéro-placentaires sont de petit calibre, conserve partiellement leur vasoréactivité et leur propriété élastique. Des observations histologiques et des biopsies de placentas provenant de femmes souffrant de PE ont démontré que la prolifération des

cellules trophoblastiques était habituelle, mais que la migration des trophoblastes dans la decidua était limitée (Redline et Patterson, 1995). Par conséquent, l'invasion du trophoblaste dans la portion myométriale des artères spiralées est très réduite, ce qui cause une réduction du flux sanguin dans l'espace intervilloux menant à une hypoxie et une ischémie placentaire, en plus d'engendrer un SO et d'exposer le fœtus à un manque d'O₂ et de nutriments (Kingdom et Kaufmann, 1997).

Ces déficiences au niveau du placenta et de la croissance du fœtus peuvent mener à une RCTU, et, dans les cas les plus sévères, à la mort du fœtus. L'hypoxie placentaire semble avoir un rôle central mais certains croient qu'elle serait plus une conséquence qu'une cause. En effet, il est suggéré que l'environnement placentaire davantage en hypoxie chez les patientes PE serait un résultat tardif de la mauvaise invasion des trophoblastes. Bien que l'étiologie de la PE reste inconnue, il est généralement accepté que cette complication soit d'origine placentaire (Huppertz, 2008).

1.2.1 Diagnostic

Au cours de l'examen prénatal, les femmes enceintes devraient être questionnées sur leurs antécédents médicaux afin d'identifier certaines conditions augmentant le risque de développer une PE (*Voir tableau 1.1*).

Tableau 1.1 | Facteurs de risque reliés à la PE***Facteurs de risque maternels***

- ❖ Primiparité (Chen *et al.*, 2009; Sibai *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2004)
- ❖ Hypertension chronique (Marik, 2009; Sibai, 2002)
- ❖ Diabète sucré préexistant (Howarth, Gazis et James, 2007; Peticca *et al.*, 2009)
- ❖ Prééclampsie antérieure (Hernandez-Diaz, Toh et Cnattingius, 2009; Lykke, Paidas et Langhoff-Roos, 2009; McDonald, Best et Lam, 2009)
- ❖ Thrombophilie pré-gestationnelle (Kahn *et al.*, 2009; Kupferminc, 2003)
- ❖ Âge maternel trop bas ou trop élevé (Jahromi et Hussein, 2008; Najati et Gojazadeh)
- ❖ Obésité et résistance à l'insuline (Bodnar *et al.*, 2005; Bodnar *et al.*, 2005; Walsh, 2007)
- ❖ Antécédents familiaux de PE (Dekker et Sibai, 2001; Lie, 2007)
- ❖ Infections maternelles (Horton *et al.*; Nguyen *et al.*, 2009; Pouliot *et al.*)

Facteurs de risque paternels

- ❖ Primipaternité (Campbell, MacGillivray et Carr-Hill, 1985; Skjaerven, Wilcox et Lie, 2002)
- ❖ Exposition limitée au sperme (Dekker, 2002; Robillard et Hulsey, 1996)
- ❖ Procréation assistée (Chen *et al.*, 2009; Salha *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002)

La PE a longtemps été considérée comme un trouble associé à la première grossesse (Chesley, 1985; Roberts, 1998). En effet, il a été démontré que les femmes nullipares sont six à huit fois plus sensibles à la PE que les femmes multipares (Chesley, 1980). Il a été suggéré qu'une mauvaise adaptation immunitaire maternelle en réponse au fœtus était une cause possible de l'augmentation du risque de PE chez les femmes nullipares (Need, 1975). Par contre, l'effet «protecteur» de la multiparité est perdu avec le changement de partenaire. La primipaternité est un facteur de risque reconnu chez les femmes multipares. De plus, cette observation suggère un fondement immunologique relié à la PE, du à l'exposition à un nouvel antigène fœtal (Li et Wi, 2000) (Need, 1975; Trupin, Simon et Eskenazi, 1996). Plusieurs études ont démontré, s'appuyant sur des mécanismes immunologiques, que la contribution paternelle était reliée au risque de développer la PE (Esplin *et al.*, 2001). La primiparité, la grossesse en bas âge, le changement de partenaire et l'insémination artificielle (Robillard, Dekker et Hulsey, 1999) représentent des événements où la femme est « naïve » face aux protéines contenues dans le sperme de son partenaire, et il a été démontré que chacune de ces situations augmentait le risque de PE (Wang *et al.*, 2002). Les protéines

contenues dans le sperme jouent un rôle central dans l'implantation et la placentation en induisant une réaction inflammatoire (Chaouat, Ledee-Bataille et Dubanchet, 2005). En effet, les relations sexuelles activent plusieurs cytokines et suscitent le recrutement des macrophages, des cellules dendritiques, des lymphocytes et des cellules tueuses (NK) dans le col de l'utérus. D'autres observations supportent aussi l'idée qu'une nouvelle exposition aux protéines contenues dans le sperme pourrait augmenter le risque de PE. Les femmes n'ayant pas souffert de PE avec un ancien partenaire ont plus de chance de développer une PE lors d'une deuxième grossesse avec un récent, nouveau partenaire (Li et Wi, 2000). Ces résultats soulèvent le lien entre la courte durée de la cohabitation sexuelle avant la conception et le risque de développer une PE (Robillard *et al.*, 1994).

Dans un autre ordre d'idée, en 2005, Bodnar établissait que le risque de PE triplait lorsque l'indice de masse corporelle (IMC) était supérieur à 30 kg/m^2 (Bodnar *et al.*, 2005) (l'IMC normal étant de $18,5$ à $24,9 \text{ kg/m}^2$) (Athukorala *et al.*). De plus, la présence d'un diabète de type I, particulièrement lors d'une atteinte rénale, a un impact sur le risque accru de développement de la PE. La néphropathie diabétique, une complication du diabète sucré, est caractérisée par une protéinurie persistante (excrétion urinaire d'albumine de 300 mg/24 h) une pression artérielle élevée, des œdèmes et une diminution de la fonction rénale. En somme, environ 20% des femmes enceintes atteintes de diabète de type I se verront développer une PE (Barden *et al.*, 2004). Finalement, il est aussi important de mentionner qu'une association de la PE avec l'activation de la cascade de coagulation a clairement été démontré (Roberts *et al.*, 1989; Salafia *et al.*, 1995). Au cours des dernières années, plusieurs études se sont concentrées sur le rôle de la thrombophilie dans la pathogénèse de la PE (Kujovich, 2004). Après 20 semaines de grossesse, les femmes devraient être questionnées sur la présence de symptômes spécifiques reliés à la PE tels qu'une perturbation de la vision, des maux de tête intenses, une douleur abdominale dans la région du foie et de l'œdème accru (Wagner, 2004).

La PE est une maladie hétérogène impliquant divers organes, ce qui rend le diagnostique difficile à établir. La PE se développe habituellement entre la 20^e semaine de grossesse et 48 h avant l'accouchement (Sibai et Stella, 2009). Les directives cliniques distinguent la PE

modérée de la PE sévère, ainsi que la PE précoce (avant 34 semaines) et tardive (après 34 semaines) (Huppertz, 2008), ce dernier étant le concept de classification le plus récent (von Dadelszen, Magee et Roberts, 2003). Les symptômes typiques de la PE modérée incluent une pression sanguine systolique ≥ 140 mm de Hg ou une pression diastolique ≥ 90 mm de Hg, et une protéinurie (≥ 300 mg par échantillon d'urine sur 24 h (ACOG, 2002), habituellement correspondant à 1+ ou plus grand lors d'un test d'urine sur bâtonnet (Wagner, 2004)). Généralement, la PE tardive démontre les symptômes modérés et concerne plus de 80% de tous les cas de PE dans le monde entier (Huppertz, 2008). La PE sévère, généralement reliée au type précoce (Huppertz, 2008), s'accompagne d'une pression systolique de ≥ 160 mm de Hg ou d'une pression diastolique de ≥ 110 mm Hg au moins à deux occasions espacées de six heures et à l'état de repos, d'une protéinurie sévère (≥ 5 g par échantillon d'urine sur 24 h, correspondant à 3+ ou plus grand sur un test d'urine avec bâtonnet (Wagner, 2004)) sur deux échantillons d'urine aléatoires collectés à au moins 4 h d'intervalle.

Les femmes développant une PE lors de leur première grossesse ont plus de chances de redévelopper une PE lors de leur prochaine grossesse. Plus précisément, quand la PE apparaît avant la 30^e semaine de la première grossesse, le taux de récurrence peut s'élever à 40% pour les grossesses futures (Report, 2000). L'hypertension et la protéinurie sont les principaux symptômes de la PE. En fait, les femmes qui développent une PE démontrent une altération dans la vasorelaxation dépendante de l'endothélium (Khan *et al.*, 2005), une vasoconstriction généralisée, une résistance vasculaire élevée et un faible rendement cardiaque (Easterling, 1992). En revanche, lors d'une grossesse normale, une diminution de la tension artérielle et de la résistance vasculaire périphérique est observée (Roberts et Gammill, 2005). Effectivement, le volume sanguin maternel et le débit cardiaque augmente d'environ 40% (Rockwell, Vargas et Moore, 2003) et le débit du flux volumique artériel triple dû à une augmentation du diamètre des artères et de leur résistance réduite (Thaler *et al.*, 1990). Ces changements dans le flux sanguin utérin sont essentiels pour satisfaire la demande métabolique du placenta et afin d'augmenter le flux de nutriments vers le fœtus en croissance (Kliman, 2000). Il a été montré que le flux sanguin utéro-placentaire pouvait être réduit de 50% en présence de PE (Lunell *et al.*, 1982).

Dans les grossesses compliquées par la PE, des adaptations hémodynamiques et vasculaires sont perturbées et apparaissent dans la circulation systémique. Beaucoup de facteurs sont impliqués dans ce dérèglement, comme la PTHrP (Maioli, Fortino et Pacini, 2004), qui joue plusieurs rôles pendant la grossesse, tels que dans la relaxation des artères utérines (Meziani *et al.*, 2005) et dans le transfert de Ca^{2+} transplacentaire (Kovacs, 1995; Kovacs *et al.*, 1996). De plus, le système rénine-angiotensine (RAS) joue un rôle essentiel dans la régulation de la tension artérielle et de l'équilibre d'électrolytes. La rénine active le RAS, menant à une augmentation de la tension artérielle. Plus précisément, la rénine clive l'angiotensinogène pour donner l'angiotensine I (ANGI) (inactive) qui mène finalement à la production d'ANGII (active). Par conséquent, la rénine a un effet limitant sur la production d'ANGII et est un facteur clé dans la régulation de la tension artérielle (Blazy *et al.*, 1989; Tsyvian *et al.*, 2008). Il est suggéré que le RAS utéro-placentaire est important pour la régénération de l'endomètre après la desquamation à la fin du cycle menstruel, et pour la décidualisation, l'implantation et la placentation. Les perturbations du RAS utero-placentaire peuvent provoquer des saignements anormaux et mener à une réduction du flux sanguin utero-placentaire dans les grossesses compliquées par la PE (Nielsen, Schauser et Poulsen, 2000).

Diverses études ont démontré que la supplémentation en Ca^{2+} pouvait diminuer la tension artérielle chez les femmes enceintes à risque de développer des désordres d'hypertension ou avec une alimentation faible en Ca^{2+} (Atallah, Hofmeyr et Duley, 2002; Gillman *et al.*, 1995; Hofmeyr, Duley et Atallah, 2007), probablement en diminuant la libération de PTHrP ou de rénine, diminuant le Ca^{2+} intracellulaire dans les muscles lisses vasculaires et par conséquent diminuant sa contractilité (Belizan, Villar et Repke, 1988; Hofmeyr, Duley et Atallah, 2007). Ainsi, en réduisant la contractilité du muscle lisse utérine, la supplémentation en Ca^{2+} pourrait réduire les naissances prématurées (Villar et Repke, 1990). Il a également été observé que l'excrétion urinaire de Ca^{2+} était reliée à l'augmentation de la tension artérielle en présence de PE. En fait, pendant la grossesse normale, le volume de liquide extracellulaire augmente et par conséquent, il y a une dilution de Ca^{2+} et une augmentation de la filtration glomérulaire, causant des pertes de Ca^{2+} (Nielsen, Schauser et Poulsen, 2000).

2.1.3 Prévention et traitements

Le traitement le plus efficace pour traiter la PE est l'accouchement (ACOG, 2002; Report, 2000). Par contre, il est préférable de retarder l'accouchement si le fœtus est prématuré, particulièrement si la mère est atteinte d'une PE modérée (Report, 2000). Plusieurs facteurs sont à considérer afin de déterminer le meilleur moment pour l'accouchement, y compris la sévérité de la condition de la mère et le risque de complications, l'état du bébé et ses chances de survie ou d'être en bonne santé s'il naît prématurément. Des signaux précis pour provoquer l'accouchement existent. Les indications fœtales incluent une RCIU grave, une surveillance fœtale alarmante ou de l'oligohydramnios (insuffisance en liquide amniotique) et les indications maternelles incluent l'âge gestationnel de 38 semaines ou plus, un compte de plaquettes en-dessous de 100 000 plaquettes/mm³, une détérioration progressive des fonctions hépatiques ou rénales, une apparence de rupture placentaire et l'éclampsie (Report, 2000). Généralement, il est préférable d'accoucher le plus tard possible, sauf en présence de PE sévère ou si le bébé se développe trop lentement en raison du mal fonctionnement placentaire. Pendant l'accouchement, des efforts sont faits afin d'empêcher les convulsions et afin de contrôler l'hypertension (ACOG, 2002). Ces symptômes doivent donc être bien contrôlés. Ainsi, plusieurs études randomisées ont rapporté l'utilisation efficace de diverses méthodes afin de réduire le taux ou la sévérité de la PE (Sibai, Dekker et Kupferminc, 2005).

Le sulfate de magnésium (MgSO₄) est un agent antihypertensif qui aide à prévenir ou à traiter les femmes avec des convulsions éclamptiques (Altman *et al.*, 2002; Witlin et Sibai, 1998). Plus précisément, les drogues antihypertensives servent à contrôler ou à empêcher la détérioration des symptômes à court terme afin d'assurer l'accouchement sécuritaire d'un bébé le plus mature possible (Grill *et al.*, 2009). Habituellement, une dose 6g de MgSO₄ suivie d'une infusion continue à un taux de 2g/h est appliquée (Altman *et al.*, 2002; Witlin et Sibai, 1998). Malgré l'utilisation commune du MgSO₄, aucune étude démontre clairement son rôle préventif dans la progression de la PE (Livingston *et al.*, 2003; Scott, 2003). Beaucoup de mesures ont été suggérées afin de prévenir la PE mais aucune n'est bien établie (ACOG, 2002; Dekker et Sibai, 2001). Ces mesures incluent la prophylaxie comme l'utilisation de l'aspirine en faible dose, l'héparine de faible poids moléculaire, la supplémentation en Ca²⁺ et

l'utilisation d'antioxydants. Ces deux dernières mesures nous intéressent plus particulièrement.

En effet, il a été démontré que les suppléments de Ca^{2+} produisaient une diminution mineure de la tension artérielle chez les femmes à risque de faire de l'hypertension ou avec une alimentation faible en Ca^{2+} (Atallah, Hofmeyr et Duley, 2002). Une des hypothèses associée avec ce résultat est que ce manque de Ca^{2+} stimulerait les hormones parathyroïdes et la libération de la rénine, ce qui mènerait à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules des muscles lisses et donc à la vasoconstriction. Ainsi, la prise de Ca^{2+} peut également avoir un effet indirect sur le fonctionnement des cellules des muscles lisses en augmentant le taux de magnésium. Les résultats de plusieurs études ont mené à la recommandation d'une prise de Ca^{2+} d'au moins 1,5 g/jour, commençant à la 15^e semaine de grossesse et maintenue tout au long de la grossesse, dans les populations avec une consommation calcique de base d'environ 600 mg/jour, particulièrement chez les patientes à haut risque de PE (Hofmeyr, Duley et Atallah, 2007).

D'un autre côté, il a été proposé qu'un trop grand SO, caractérisé par une surproduction d'espèces réactives d' O_2 couplée avec des mécanismes de défense inadéquats, puisse être une cause du malfonctionnement général de l'endothélium observé lors de PE (Redman et Sargent, 2009). La vitamine C provenant de l'alimentation est un capteur de radicaux libres agissant en phase liquide, alors que la vitamine E agit *in vivo* en empêchant la formation des peroxydes de lipide (Polyzos *et al.*, 2007). Ces vitamines protègent ainsi les enzymes, les protéines et les cellules contre la destruction causée par le SO. La PE est associée avec une diminution de ces antioxydants, étant essentiels dans le maintien des défenses de l'organisme face au SO (Polyzos *et al.*, 2007). Par contre, certaines études ne soutiennent pas des conclusions optimistes au sujet de l'utilisation d'antioxydants (Poston *et al.*, 2006; Rumbold *et al.*, 2006). Elles ont démontré que la combinaison de 1000 mg de vitamine C et de 400 unités internationales de vitamine E ne réduisait pas le risque de PE. De plus, une étude clinique randomisée sur les suppléments de vitamine C et de vitamine E n'ont pas démontré les effets des antioxydants alimentaires exogènes sur la PE (Poston *et al.*, 2006). D'un autre côté, comme l'activité physique régulière est connue pour augmenter les défenses antioxydantes endogènes, il a été suggéré qu'elle puisse réduire le risque de PE (Sorensen *et*

al., 2003; Yeo et Davidge, 2001). Une étude clinique randomisée comparant l'effet de la marche et de l'étirement sur la PE a démontré que l'incidence de la PE était de 14.6% parmi les marcheurs et de 2.6% parmi les gens faisant les étirements. D'ailleurs, le niveau moyen de la transferrine, un marqueur antioxydant, était sensiblement plus élevé dans le groupe faisant les étirements. Ils ont donc conclu que les exercices d'étirements réguliers peuvent favoriser l'action des antioxydants endogènes chez les femmes à risque de développer une PE (Yeo *et al.*, 2008). Évidemment, d'autres recherches avec un plus grand échantillonnage sont nécessaires afin de déterminer la synchronisation optimale, l'intensité et d'autres types d'exercices qui pourraient être profitables pour la femme enceinte. Pour finir, la thérapie antioxydante n'est pas actuellement officiellement recommandée (ACOG, 2002; Chappell *et al.*, 1999; Report, 2000) mais la recherche sur cette alternative se voit prometteuse (Chappell *et al.*, 1999).

Finalement, les femmes atteintes de PE qui ne reçoivent pas de soins prénataux sont 7 fois plus à risque de décéder suite aux complications liées à la PE (MacKay, Berg et Atrash, 2001). Les femmes de race noire semblent être 3 fois plus affectées par la mort maternelle que les caucasiennes. Les raisons précises des différences raciales demeurent incertaines mais les disparités dans l'état de santé, l'accès ou la qualité des soins prénataux (MacKay, Berg et Atrash, 2001) et l'insuffisance de vitamine D (Mulligan *et al.*, 2009) pourraient expliquer partiellement ce phénomène. Le dépistage précoce, le suivi et le traitement de la PE sont des facteurs cruciaux afin d'empêcher une fin tragique causée par la PE.

1.3 Rôle du placenta dans la prééclampsie

Le placenta remplit plusieurs rôles critiques pendant la grossesse. Par exemple, en tant qu'interface entre le fœtus et la mère, il sert à prévenir le rejet de l'allogreffe fœtale. En plus de sa fonction en tant que barrière immunitaire, à l'aide de son épithélium spécialisé, le placenta joue un rôle dans le transport de gaz, de nutriments et de déchets. Il fonctionne également comme un organe majeur de synthèse pour une variété de protéines et d'hormones stéroïdes régulant les systèmes placentaire, fœtal et maternel (Myatt, 2002). Comme déjà mentionné plus tôt, la présence du placenta est nécessaire pour provoquer une PE (Myatt, 2002). Cela suggère soit que le placenta sécrète un facteur humoral provoquant le syndrome

maternelle de la PE (l'hypertension, la protéinurie et l'œdème) ou bien que l'adaptation maternelle à la barrière placentaire est insuffisante et entraîne alors la PE.

De plus, une invasion insuffisante de la paroi utérine est impliquée dans la PE. Contrairement à une invasion tumorale, cette invasion trophoblastique est précisément régulée, limitée à l'endomètre, au premier tiers du myomètre et aux artérioles spiralées associées (Zhou, Damsky et Fisher, 1997). Il est maintenant accepté que l'invasion trophoblastique anormale des artères spiralées lors de PE soit directement liée à la physiopathologie de la PE, bien que la cause de cette invasion anormale soit toujours sous étude. Par contre, il est clair que cette invasion anormale entraîne des conséquences graves pour le développement global du placenta (Myatt, 2002), entre autres en exposant le placenta à une forte hypoxie.

1.3.1 Stress oxydatif dans le placenta

Le SO se décrit comme étant un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'O₂ (ROS) et les activités antioxydante pour les capter. L'ischémie/perfusion et l'hypoxie sont des conditions pouvant conduire au SO (Many *et al.*, 2000). La grossesse est caractérisée comme un état de SO dans la circulation maternelle et dans le placenta, et ce SO semble être exacerbé dans la PE. Diverses évidences d'un SO élevé dans le placenta PE ont été observées, entre autres par l'observation de concentrations élevées d'isoprostanes et de malondialdéhyde (Skoczylas-Pietrzyk, Stryjecka-Zimmer et Oleszczuk, 1998; Walsh *et al.*, 2000), de peroxydes lipidiques (Gratacos *et al.*, 1998; Gratacos *et al.*, 1999), d'une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase dans le cytotrophoblaste invasif (Many *et al.*, 2000), d'une augmentation de carbonyles sur les protéines (Zusterzeel *et al.*, 2001) et de la présence des résidus nitrotyrosine, un marqueur de la formation et l'action du prooxydant puissant peroxynitrite dans le tissu vilieux (Lyll *et al.*, 1998; Myatt *et al.*, 1996; Stanek, Eis et Myatt, 2001) et le cytotrophoblaste invasif (Many *et al.*, 2000). Une diminution de l'expression en ARNm et de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase a également été observée dans les placentas PE, ce qui suggère une diminution des défenses antioxydantes (Wiktor et Kankofer, 1998).

Que la diminution du taux d'antioxydants soit l'événement originel entraînant un SO ou qu'il soit plutôt le résultat d'une trop grande consommation lors de la réduction des ROS reste

encore inconnue. Par contre, le concept expliquant la PE comme un état de SO est de plus en plus accepté et fonde l'hypothèse unificatrice pouvant expliquer l'affection vasculaire maternelle et fournir des explications sur la dysfonction placentaire rencontrée en PE (Hubel, 1999). Cela a également conduit à des essais cliniques avec des antioxydants afin de prévenir la PE. En effet, une étude à petite échelle d'une thérapie antioxydante à l'aide de vitamines C et E chez les femmes à risque élevé de développer une PE a montré un effet positif dans la réduction de l'incidence de la maladie chez la mère (Chappell *et al.*, 1999; Trudinger *et al.*, 1985). Plusieurs essais à grande échelle sont actuellement en cours ou sur le point de commencer.

1.3.2.1 Réactivité vasculaire du placenta en relation au stress oxydatif

Plusieurs évidences démontrent la structure et la réactivité vasculaire anormales du placenta en PE. De plus, l'analyse d'ondes ultrasonores de Doppler a démontré une résistance vasculaire accrue dans la circulation fœto-placentaire en PE (Chappell *et al.*, 1999; Trudinger *et al.*, 1985; Trudinger et Ishikawa, 1990). Que ce soit une réponse à l'hypoxie placentaire ou plutôt une adaptation au débit sanguin anormal, cela reste à être établi.

En l'absence d'innervation autonome, la résistance vasculaire de la circulation fœto-placentaire est contrôlée par des agents autocrines ou paracrines ou encore par des facteurs humoraux (Myatt, 1992). Les régulateurs vasculaires placentaires importants chez l'humain comprennent le système rénine-angiotensine (Glance *et al.*, 1984; Glance, Elder et Myatt, 1985), l'endothéline (Myatt, Brewer et Brockman, 1992), l'oxyde nitrique (NO) (Myatt *et al.*, 1993), le monoxyde de carbone (Lyall *et al.*, 2000), l'histamine, la sérotonine (Bertrand et St-Louis, 1999), les prostaglandines (Livingston *et al.*, 2001), les peptides natriurétiques (Holcberg *et al.*, 1995; Holcberg *et al.*, 1995; Holcberg *et al.*, 1995), la PTH, la PTHrP et le peptide lié au gène de la calcitonine (Mandsager, Brewer et Myatt, 1994), l'adrénomedulline (Jerat *et al.*, 2001), l'urocortine (Clifton *et al.*, 2000), et la corticotropine (Clifton *et al.*, 1995). L'existence d'altérations dans la production et la réponse de plusieurs de ces facteurs a clairement été démontré en présence de PE. Il est maintenant généralement admis que la synthèse des vasodilatateurs dans le placenta est augmentée dans la PE, représentant peut-être une adaptation à la résistance vasculaire accrue (Norris *et al.*, 1999; Shaamash *et al.*, 2001).

Bien qu'il y ait des preuves notables démontrant le SO et l'altération de la réactivité vasculaire dans le placenta PE, ce n'est que récemment que les expériences visent à démontrer une relation directe entre ces deux phénomènes. Un produit du SO et de la peroxydation des lipides, 8-iso-PGF_{2α}, agit comme vasoconstricteur. Il a été démontré que l'effet vasoconstricteur maximal de 8-iso-PGF_{2α} est significativement réduit dans les artères placentaires prééclamptiques (Kwek *et al.*, 2001).

Le SO, accompagné d'une concentration intracellulaire élevée de Ca²⁺, ainsi que la dysfonction endothéliale sont des éléments majeurs de la PE. La PE est généralement considérée comme une maladie à deux étapes (Roberts et Gammill, 2005; Roberts et Hubel, 2009). Initialement, le placenta PE est affecté par le SO (Hung et Burton, 2006). Les ROS ont été reconnus comme des messagers secondaires dans les cascades intracellulaires et le stress du réticulum endoplasmique (RE) a été récemment identifié comme un régulateur majeur de l'homéostasie cellulaire (Cindrova-Davies, 2009; Zhang et Kaufman, 2008). Le RE dessert de nombreuses fonctions spécialisées dans la cellule, y compris la synthèse, le repliement et le transport des protéines membranaires et sécrétées, et la séquestration du Ca²⁺. Le repliement des protéines et la production de ROS dans le RE sont des événements étroitement liés, et les cibles typiques de la signalisation des ROS sont les canaux calciques intervenant à long terme et à court terme dans la réponse cellulaire au SO (Redman, 2008; Yung *et al.*, 2008). Le dysfonctionnement des cellules endothéliales a été identifié comme l'étape finale la plus commune dans la pathogénèse de la PE, mais la réaction au stress est plus étendue. Effectivement, il est possible d'observer des changements connexes tels que des réponses aiguës et des réponses métaboliques provoquées par le système inflammatoire (Redman et Sargent, 2009).

Certaines études ont suggéré que la dysfonction endothéliale est un phénomène majeur de la pathologie de la PE (Roberts, 1998; Roberts et Redman, 1993). Même si la dysfonction endothéliale peut contribuer à la PE, la résistance vasculaire périphérique est déterminée par le tonus des muscles vasculaires lisses, lequel dépend de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ et de la sensibilité du muscle à la concentration de Ca²⁺ intracellulaire ([Ca²⁺]_i). Les stimuli contractiles augmentent la [Ca²⁺]_i en stimulant l'influx de Ca²⁺ par les canaux calciques, et la libération de Ca²⁺ des sites de stockage intracellulaires associés avec le RE

(Hughes, 1995). Les vasoconstricteurs peuvent aussi augmenter la sensibilité des muscles contractiles aux changements de $[Ca^{2+}]_i$ en inhibant, par exemple, la phosphatase myosine via la kinase rho (Somlyo et Somlyo, 2000). La régulation et la sensibilité du $[Ca^{2+}]_i$ dans la PE est donc un facteur important dans la compréhension de l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique observée en PE (Wimalasundera *et al.*, 2005).

1.3.2 Conclusions

Pour conclure cette section, même s'il est clair que la présence du placenta est nécessaire pour provoquer le syndrome maternel de la PE, la relation de cause à effet n'est pas encore claire. Les facteurs causant le rejet du placenta (engendrant le syndrome maternel) ou l'altération de l'interaction normale materno-placentaire ne sont pas encore identifiés. Du moins, il est clair que la fonction placentaire est modifiée au moment de la manifestation de la PE et que ces changements ont des effets indésirables sur les interactions foeto-placentaires et sur le bien-être du fœtus. Encore une fois, il reste à déterminer si ces changements sont une cause ou une conséquence de la pathologie apparaissant en début de la grossesse. Plusieurs évidences suggèrent que l'invasion anormale du trophoblaste se produit dans le premier trimestre de la grossesse et que cela peut contribuer à l'hypoxie et au SO placentaire, ce qui pourrait aggraver davantage l'état du placenta (Myatt, 2002).

La PE est une pathologie hétérogène et multifactorielle. En effet, beaucoup d'autres observations suggèrent un rôle pour d'autres facteurs tels que la prédisposition génétique de la mère, l'alimentation, l'environnement et les comportements, pouvant indépendamment contribuer au développement de la PE. Il est donc nécessaire de continuer à explorer le rôle de tous ces facteurs impliqués dans la PE afin d'être en mesure d'avoir une meilleure compréhension de cette pathologie énigmatique.

1.4 Le calcium

Le calcium est le nutriment essentiel le plus abondant dans le corps humain. La forme ionique du calcium, le Ca^{2+} , joue le rôle de messenger universel intracellulaire modulant une panoplie de procédés cellulaires vitaux, comme la neurotransmission, la sécrétion d'enzymes et d'hormones, ainsi que de procédés biologiques, comme la régulation du cycle cellulaire et

de la mort programmée des cellules (Belkacemi *et al.*, 2005). De plus, au cours de la grossesse, le Ca^{2+} est nécessaire à la minéralisation des os, à la contraction des muscles ainsi qu'à la différenciation tissulaire. C'est lors du troisième trimestre que la majorité du Ca^{2+} , provenant du régime alimentaire de la mère, est accumulée (80%). Lors de grossesses normales, l'ajustement de l'homéostasie calcique maternel débute tôt, bien que la demande maximale du fœtus n'apparaisse qu'au 3^e trimestre de la grossesse. Afin qu'une telle quantité de Ca^{2+} soit transférée de la mère au fœtus, plusieurs ajustements de l'homéostasie calcique maternelle doivent être faits, notons par exemple une augmentation de l'absorption intestinale d'environ deux fois, une diminution de l'excrétion par les reins et une augmentation de la résorption des os (Hosking, 1996).

1.4.1 Régulation hormonale

1.4.1.1 La vitamine D

Il est connu que la vitamine D est une des hormones calciques les plus importantes. La vitamine D_3 (cholécalférol) est hydroxylée dans le foie pour former la 25-(OH)D_3 . Ensuite, dans les reins, cette molécule est hydroxylée pour une deuxième fois par l'enzyme $25\text{-hydroxyvitamine D}_3\text{-1}\alpha\text{ hydroxylase}$ ($25\text{-(OH)D}_3\text{-1}\alpha\text{-(OH)ase}$) afin de générer la forme active $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Cette réaction est contrôlée par la PTH. En hypocalcémie, le $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ est le régulateur principal de l'absorption intestinal de Ca^{2+} , où il agit afin d'augmenter la concentration sanguine de Ca^{2+} en conjonction avec la PTH dans les reins et les os (Hosking, 1996).

1.4.1.2 La PTHrP

Il est connu que le sang fœtal est plus concentré en Ca^{2+} que le sang maternel (Garel et Barlet, 1976). Ainsi, le gradient de Ca^{2+} materno-fœtal est maintenu par la présence de l'hormone PTHrP, produite durant la grossesse par la glande parathyroïde fœtale, le ST, l'amnion, le chorion et par le cordon ombilical. La PTHrP possède une homologie en N-terminal avec l'hormone PTH, permettant à ces deux protéines de se lier au même récepteur transmembranaire PTH/PTHrP (Curtis *et al.*, 1998). Pour l'instant, les connaissances sur les

échanges calciques placentaires sont basées sur des observations physiologiques, mais les mécanismes réels de ce transport sont encore mal compris.

1.4.1.3 Les hormones stéroïdiennes (œstrogènes et progestérone)

Lors de la grossesse, la quantité de progestérone et d'œstradiol produite par l'unité fœto-placentaire est croissante, mais le ratio reste toujours inchangé. Cette production est très intense et semble avoir un rôle majeur pour le maintien de l'utérus dans un état de repos afin d'assurer la continuité de la grossesse jusqu'à terme (Malassine et Cronier, 2002).

De nombreuses études antérieures ont montré que l'œstradiol pouvait moduler la production hormonale placentaire (Petraglia *et al.*, 1996). La présence d'ARNm du récepteur de l'œstradiol a été démontrée par RT-PCR dans le trophoblaste villos, et la protéine du récepteur de l'œstradiol a été localisée dans les noyaux du ST en culture (Billiar, Pepe et Albrecht, 1997), suggérant que le ST est un syncytium sensible aux œstrogènes. L'action de la progestérone sur le trophoblaste est plus douteuse. En effet, les effets sont variés et pourraient être dus à une action du stéroïde de type glucocorticoïde-like. De son côté, la progestérone pourrait augmenter, diminuer ou n'avoir aucun effet sur la production d'hCG (Merz, 1996; Petraglia *et al.*, 1996), et il a été démontré que la progestérone régulait l'expression de l'ostéopontine, un inhibiteur de minéralisation impliqué dans plusieurs maladies, telles que plusieurs cancers et maladies vasculaires (Omigbodun *et al.*, 1997). La présence du récepteur de la progestérone dans le trophoblaste est aussi un sujet de débat. À l'aide de la méthode de western blot, Karalis et al. (Karalis, Goodwin et Majzoub, 1996) ont pu observer la présence du récepteur des glucocorticoïdes dans le trophoblaste villos en culture, mais pas celle du récepteur de la progestérone. Par contre, ce dernier a été observé par immunocytochimie, par des méthodes de liaisons (e.g ELISA) et par RT-PCR (Rossmanith *et al.*, 1997).

De plus, il a été démontré que l'œstradiol stimulait la production de hCG et de hCS, ainsi que la formation du ST (Malassine et Cronier, 2002). Malassine et ses collaborateurs ont aussi démontré que des concentrations physiologiques de progestérone n'avaient aucun effet sur la différenciation du trophoblaste. Aussi, chez la femme, une élévation significative du ratio $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ a été observée parallèlement au pic de concentration d'œstrogènes et lors de

l'augmentation de progestérone durant le cycle menstruel (Muneyvirici-Delale *et al.*, 1998). Aussi, de faibles doses d'œstrogènes sont bénéfiques et peuvent protéger le système cardiovasculaire, le système nerveux central et prévenir l'ostéoporose (Muneyvirici-Delale *et al.*, 1998).

1.5 Les transporteurs calciques

Le Ca^{2+} est un messager intracellulaire très versatile pouvant réguler différentes fonctions cellulaires (Berridge, Lipp et Bootman, 2000; Carafoli *et al.*, 2001). À tout moment, le niveau de Ca^{2+} intracellulaire est déterminé par une balance entre les réactions introduisant le Ca^{2+} dans le cytoplasme et les réactions séquestrant ou en faisant sortir le Ca^{2+} de la cellule. Plusieurs protéines sont impliquées dans le transfert de Ca^{2+} et seront à l'étude lors de ce projet. En effet, l'absorption transcellulaire de Ca^{2+} , du côté maternel, est initialement régulée par l'influx de Ca^{2+} au travers de la membrane luminale des cellules épithéliales, et dirigée par les canaux transitoires à potentiel vanilloïdes TRPV5 et TRPV6. Ces canaux font partie de la grande famille des *transient receptor protein (TRP) ion-channel family* (Clapham, Runnels et Strubing, 2001; Montell, Birnbaumer et Flockerzi, 2002). Ensuite, le Ca^{2+} pénètre le ST et est séquestré par les protéines de liaison au Ca^{2+} (CaBP-9k et CaBP-28k) servant de tampons afin de maintenir une faible concentration calcique cytosolique. Subséquemment, ces CaBPs liés au Ca^{2+} diffusent vers le côté basolatéral de la cellule, où le Ca^{2+} sera expulsé dans la circulation sanguine fœtale via les échangeurs sodium/calcium (NCX) et les pompes calciques PMCA1 et PMCA4 (Schoeber, Hoenderop et Bindels, 2007). Les pompes PMCA ont des taux de transport plus faible mais une plus grande affinité que les échangeurs NCX (Berridge, Bootman et Roderick, 2003). Comme il a été démontré que les échangeurs NCX ne possédaient pas un rôle primordial dans le transfert de Ca^{2+} transplacentaire (Lafond et Simoneau, 2006), ces protéines ne seront pas mises à l'étude dans ce travail. La voie de signalisation intracellulaire du Ca^{2+} peut se résumer ainsi : des stimulations extracellulaires faites par la tyrosine kinase et les récepteurs couplés à la protéine-G activent une cascade de réactions menant à la production du second messenger IP3 (inositol 1-4,5-triphosphate) (Bezprozvanny, 2005; Mikoshiba, 2007) qui se liera à son récepteur (IP3R), se trouvant dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ce qui déclenchera la libération du Ca^{2+} emmagasiné dans le RE vers le cytosol. Les récepteurs ryanodine (RyR) sont des canaux

calciques participant aussi à la libération de Ca^{2+} du RE (Berridge, Bootman et Roderick, 2003; Bootman et Berridge, 1995). La libération de Ca^{2+} du RE doit être suivie par un remplissage via les réticulum sarco-endoplasmiques ATPases (SERCA) (East, 2000; Periasamy, Bhupathy et Babu, 2008). De plus, la mitochondrie participe aussi au stockage de Ca^{2+} intracellulaire à l'aide de ses canaux VDAC (*voltage dependent anion channels*) (Dulhunty *et al.*, 2006). La section qui suit saura vous informer davantage sur ces transporteurs calciques importants dans le transport de Ca^{2+} transplacentaire.

1.5.1 Transport de calcium transplacentaire

1.5.1.1 TRPVs

Les canaux TRPV5 et TRPV6 sont les cibles principales du contrôle hormonal du transport calcique actif cellulaire dans les épithéliums faisant le transfert de Ca^{2+} (Lafond et Simoneau, 2006). Ces canaux sont classés comme canaux calciques sélectifs de la famille des récepteurs transitoires à potentiel (TRP) vanilloïdes (V). Les canaux TRP ont tendance à avoir une faible conductance, donc ils peuvent fonctionner sur de plus grandes périodes sans surcharger la cellule avec une trop grande quantité de Ca^{2+} . Les membres de cette famille sont particulièrement importants dans le contrôle des procédés cellulaires lents, comme la prolifération cellulaire (Berridge, Bootman et Roderick, 2003). La régulation de ces canaux est particulièrement importante car ils travaillent contre le gradient de concentration. De plus, il a été démontré que ces canaux sont 100 fois plus spécifiques pour le Ca^{2+} que pour les ions univalents. Ainsi, TRPV5 et TRPV6 sont considérés comme « gardiens » du transport calcique transcellulaire (Schoeber, Hoenderop et Bindels, 2007). La présence de ces canaux dans le placenta a été démontrée pour la première fois en l'an 2000, accompagnée de l'observation que TRPV6 était 800 fois plus exprimé que TRPV5 (Peng *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré que ces canaux étaient majoritairement exprimés sur le côté maternel du placenta, démontrant leur importance dans l'entrée du Ca^{2+} dans le ST. Depuis, plusieurs découvertes suggèrent que l'induction de la production de TRPV5/6 pourrait être importante pour la régulation du transport de Ca^{2+} dans le ST (Lafond et Simoneau, 2006).

Il a été démontré que dans les organes absorbant le Ca^{2+} , l'expression de TRPV6 était régulée par la vitamine D, l'œstrogène et le Ca^{2+} provenant de la nutrition (Bernucci *et al.*, 2006; Kim

et al., 2006; Lee et Jeung, 2007). De plus, la thérapie utilisant l'œstrogène chez les femmes ménopausées induit l'expression d'ARNm du TRPV6 duodénal, ce qui suggère que cette hormone module l'expression de TRPV6 (Weber *et al.*, 2001). Des expériences ont démontré que chez le rat, la progestérone semblait être un régulateur dominant de TRPV6 via l'activation de son récepteur (Kim *et al.*, 2006), tandis qu'aucun effet n'a été observé lors d'un traitement avec un anti-œstrogène (Lee *et al.*, 2009). Ce mécanisme semble être inversé chez la souris. Effectivement, Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2009) ont observé qu'un anti-œstrogène diminuait significativement l'expression placentaire de TRPV6 murin, tandis que l'anti-progestérone n'avait aucun effet. En conclusion, l'expression placentaire de TRPV6 pourrait être majoritairement régulée par l'œstrogène chez la souris, contrairement à une régulation par la progestérone chez le rat (Lee *et al.*, 2009). Cependant, très peu est connu sur la régulation de TRPV5/6 en fonction du transport de Ca^{2+} dans le placenta humain, soulignant l'importance de la recherche présentée ici.

1.5.1.2 CaBPs

Le Ca^{2+} intracellulaire est un second messager crucial et sa régulation intracellulaire est essentielle pour la survie du fœtus. Plusieurs études suggèrent que les protéines de liaison au Ca^{2+} (CaBPs) jouent un rôle primordial dans la régulation et/ou le transport du Ca^{2+} . La majorité des CaBPs démontre une forte spécificité cellulaire ou tissulaire dans leur mode d'expression (Heizmann et Hunziker, 1991). De plus, plusieurs études démontrent que l'expression des CaBPs est influencée par les hormones stéroïdes, l'œstrogène et par la PTHrP dans le placenta humain (Hershberger et Tuan, 1998) (Choi, Leung et Jeung, 2005). Aussi, lors de l'absorption intestinale du Ca^{2+} , CaBP-9k est régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par la forme active de la vitamine D (1,25-(OH) $_2$ D $_3$) (Darwish et DeLuca, 1992; Wasserman et Fullmer, 1989). Bien qu'il nous manque encore beaucoup d'information afin d'élucider le rôle exact des CaBPs dans le placenta humain, il a été démontré que le transport actif du Ca^{2+} au travers de l'épithélium est relié à la CaBP-9k et à la CaBP-28k (Nikitenko *et al.*, 1998). Ainsi, il est primordial d'essayer d'élucider le rôle exact de ces protéines dans le placenta humain.

1.5.1.3 PMCAs

Une fois dans le ST, le Ca^{2+} doit traverser vers le fœtus. Cette expulsion du côté fœtal est assuré, entres autres, par les PMCAs et les NCXs. Le rôle principal des PMCAs est d'éliminer le Ca^{2+} en excès de la cellule, et, dans un état de repos, de maintenir la concentration calcique cytosolique à une concentration nanomolaire, protégeant les cellules d'une surcharge létale de Ca^{2+} . Dans le placenta humain, les PMCAs répondent aux besoins spécifiques en Ca^{2+} du fœtus. En effet, pendant le 3^e trimestre de la grossesse, le placenta transfère environ 140mg/kg/jour et ces pompes calciques ATP-dépendantes semblent être les protéines principales impliquées dans l'extrusion de Ca^{2+} du ST (Salle *et al.*, 1987). Les enzymes PMCA1 et PMCA4 sont ubiquitaires, suggérant que leur rôle est plutôt général, comparativement aux PMCA2 et PMCA3 étant tissus-spécifiques (Lafond et Simoneau, 2006). De plus, ces enzymes sont fortement modulées par l'hormone PTHrP produite presque seulement lors de la grossesse (Senior, Heath et Beck, 1991).

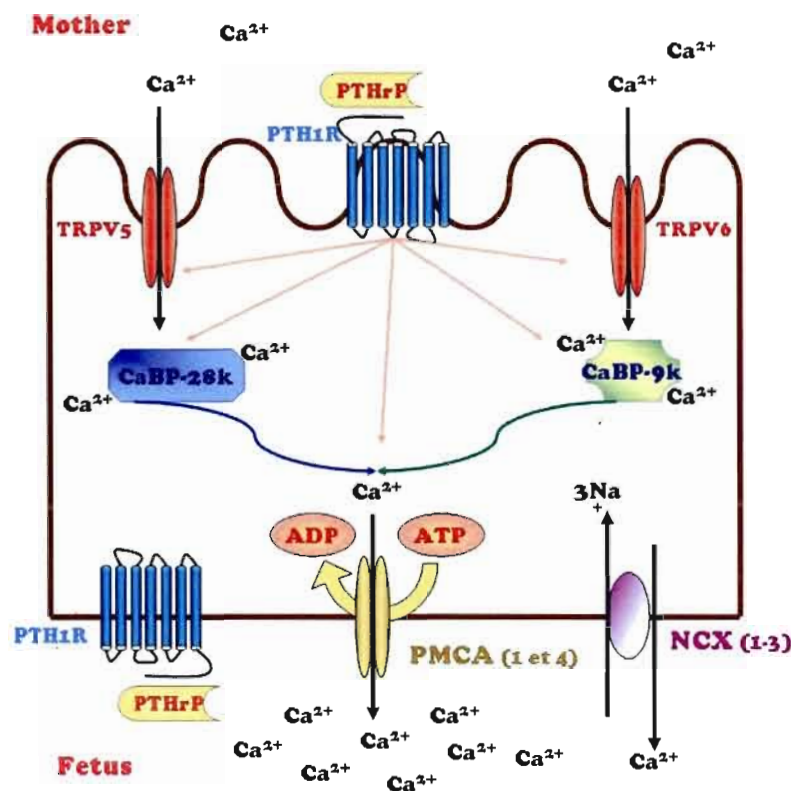


Figure 1.3 Schématisation du syncytiotrophoblaste humain et de ses protéines associées, impliquées dans le transport de Ca^{2+} transplacentaire. Comme la concentration calcique du côté maternel est plus concentrée que le milieu intracellulaire du syncytiotrophoblaste, le calcium entre de façon passive par les canaux récepteurs vanilloïdes (TRPVs). Le calcium est ensuite séquestré par les protéines de liaison CaBPs, qui déplacent le calcium de l'autre côté du syncytium, afin qu'il soit pris en charge par les pompes à calcium (PMCA) et les échangeurs sodium-calcium (NCXs), lesquels le libéreront de façon active vers la circulation fœtale. Image tirée de Lafond et Simoneau, 2006

1.5.2 Homéostasie calcique intracellulaire

Les cellules investissent une grande partie de leur énergie dans le changement de leur concentration en Ca^{2+} , laquelle possède un gradient de concentration de Ca d'environ 20 000 fois inférieure (≈ 100 nM libre) à la concentration extracellulaire (de l'ordre de mM). Au contraire, la concentration du « cousin » du Ca^{2+} , le Mg^{2+} , diffère à peine des deux côtés de la membrane plasmique (Clapham, 2007). Alors pourquoi tant d'énergie est dépensée afin d'expulser le Ca^{2+} du cytosol? Une des raisons est que le Ca^{2+} se lie très faiblement à l'eau, contrairement au Mg^{2+} , et précipite le phosphate. Ainsi, les cellules agissent de manière à séquestrer ce dangereux divalent afin d'en diminuer la concentration intracellulaire mais aussi afin d'utiliser son énergie de liaison pour faire de la transduction de signaux (Clapham, 2007). La survie cellulaire dépend donc de l'homéostasie calcique (Berridge, Bootman et Roderick, 2003). Afin de maintenir une faible concentration calcique cytoplasmique, les pompes calciques ATPases échangent des protons pour 2 Ca^{2+} (dans le cas des SERCAs) et 1 Ca^{2+} (dans le cas des PMCAs) par ATP hydrolysée (Strehler et Treiman, 2004). Le RE et la mitochondrie séquestrent activement le Ca^{2+} . La vaste distribution de ces compartiments à Ca^{2+} assure qu'une faible quantité de Ca^{2+} soit libre avant son extrusion vers le milieu extracellulaire (Clapham, 2007).

1.5.2.1 IP_3R

Bien qu'ils soient fréquemment appelés « canaux calciques », les IP_3Rs sont plutôt des canaux cationiques non-sélectifs. Le complexe IP_3R est massif : son pore est formé d'un homotétramère d'environ 3000 acides aminés (Clapham, 2007). Les IP_3Rs sont régulés entre autres par le messenger secondaire IP_3 , dont la liaison augmente la sensibilité du récepteur au Ca^{2+} , lequel a une action biphasique (il est activé à faible concentration de Ca^{2+} (>1 μM) et est inhibé en présence de plus forte concentration de Ca^{2+} (>10 μM), comme après une libération de Ca^{2+} (Berridge, Bootman et Roderick, 2003; Foskett *et al.*, 2007). L' IP_3 peut être stimulé par diverses isoformes de phospholipase C (PLC), par exemple, il peut être stimulé par les récepteurs couplés à la protéine-G ou les récepteurs couplés à la tyrosine kinase.

1.5.2.2 RyRs

Tout comme le IP₃R, le RyR est un canal tétramérique massif et perméable au Ca²⁺ étant réparti dans la membrane du RE. Son agoniste naturel primaire est le Ca²⁺. En effet, une faible (μM) concentration de Ca²⁺ engendre l'ouverture des canaux afin de libérer le Ca²⁺ dans l'espace intracellulaire. Par contre, une plus forte concentration de Ca²⁺ à proximité de ces canaux inhibera leur ouverture, dans le but de prévenir une surcharge de Ca²⁺ intracellulaire, qui peut être létale (Waring, 2005).

Les IP₃Rs et les RyRs sont sensibles au statut redox des cellules, à l'oxyde nitrique et aux quinones/ ROS (Waring, 2005). La grande distribution spatiale des IP₃Rs et des RyRs à l'intérieur de cellules aux structures très diversifiées est encore mal comprise.

1.5.2.3 VDACS

Le Ca²⁺ est très important dans la régulation de la fonction mitochondriale, de son mouvement et de sa viabilité. Comme chez le RE, la mitochondrie peut aussi emmagasiner le Ca²⁺, mais à l'aide de mécanismes de régulation distincts. Le Ca²⁺ peut diffuser aisément au travers de larges pores dans la membrane externe de la mitochondrie et aussi par les canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) (Clapham, 2007; Dulhunty *et al.*, 2006).

Le Ca²⁺ stimule les diverses déshydrogénases mitochondriales sensibles au Ca²⁺, dont celles du cycle de Krebs, ce qui augmente la production d'ATP (McCormack, Halestrap et Denton, 1990). Les auteurs d'un article récent suggèrent que la régulation de l'ATP par le Ca²⁺ est finement ajustée à la demande spécifique et la fonction des divers organes (Griffiths et Rutter, 2009). Une augmentation de la production d'ATP signifie que plus d'O₂ est réduit en eau, accompagné d'une plus grande libération d'électrons libres, lesquels résultent en la formation de superoxydes. Les ions d'O₂ ainsi que les ROS résultant sont des tueurs non-sélectifs efficaces : ils oxydent les acides gras polyinsaturés en lipides et endommagent l'ADN (Clapham, 2007).

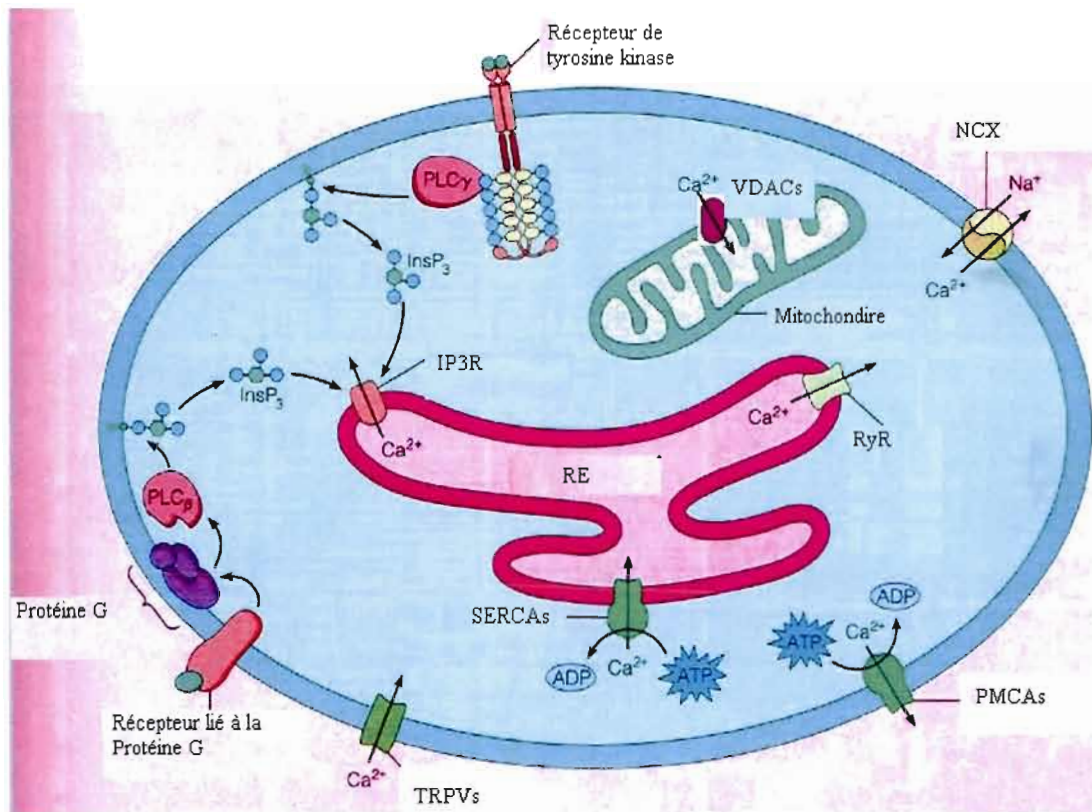


Figure 1.4 Schématisation de l'homéostasie calcique intracellulaire. La concentration de Ca^{2+} cytosolique est diminuée par l'action des pompes à Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (RE) (SERCAs), des pompes calciques membranaires (PMCAs) et des canaux à anions voltage-dépendants (VDACs) dans la mitochondrie. La concentration cytosolique de Ca^{2+} peut augmenter grâce à l'ouverture des récepteurs vanilloïdes (TRPVs) dans la membrane plasmique, et de la libération d'ions par les récepteurs d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3Rs) et les récepteurs de ryanodine (RyRs), situés dans la membrane du RE. Image modifiée, tirée du site internet «Cell Biology, Chapter 6 Cell Signaling »

[http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail6.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail6.htm)

1.6 Hypothèses de travail

En s'appuyant sur les connaissances exposées ci-dessus, nous proposons que **(1)** chez les grossesses caractérisées par la PE, le transport transplacentaire de Ca^{2+} par le ST est perturbé. Nous proposons que la variation génique et l'expression des protéines reliées au transfert de Ca^{2+} soient affectées de manière à diminuer la sortie de Ca^{2+} du côté fœtal. En effet, le SO dans le placenta devrait être plus important dans les échantillons affectés par la PE que dans les échantillons normaux, et ainsi (i) réduire l'expression des PMCA, sachant les effets négatifs des radicaux libres sur la fluidité des membranes et sur la production d'ATP. Ceci contribuerait à une diminution de l'extrusion de Ca^{2+} vers le fœtus et à une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} . En conséquence, cette hausse de Ca^{2+} intracellulaire pourrait résulter en (ii) l'inhibition de l'expression des CaBPs et (iii) des canaux calciques entrant (TRPVs), pouvant être régulés à la baisse face à une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique afin d'éviter l'atteinte d'une concentration calcique potentiellement toxique. Face à cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, nous nous attendons à ce que le syncytiotrophoblaste réponde en augmentant ses réserves calciques au niveau de RE et de la mitochondrie, soit par (iv) une augmentation de l'expression des transporteurs SERCA et VDAC, respectivement. Parallèlement, la libération de Ca^{2+} par ces organites devrait être diminuée, phénomène pouvant être perçu par (v) une diminution des récepteurs IP3R et RyR. En plus du SO, une **(2)** diminution des récepteurs de la PTHrP, de la vitamine D, de l'œstradiol et de la progestérone pourrait interférer directement avec le transfert calcique du placenta par la répression des transporteurs calciques, connus pour être régulés à la baisse dans le cas d'une faible activité de ces hormones.

CHAPITRE II.

ARTICLE SCIENTIFIQUE

1.1 Contributions

Titre de l'article :

**ALTERATION OF CALCIUM HOMEOSTASIS IN PRIMARY PREECLAMPTIC
SYNCYTIOTROPHOBLASTS: EFFECT ON CALCIUM EXCHANGE IN
PLACENTA.**

Auteure principale: Sophie HACHÉ

Collaborateurs: Takser, L., LeBellego, F., Weiler, H., Leduc, L., Forest, JC., Giguère, Y,
Masse, A. Barbeau, B.

Directrice de recherche : J. Lafond

L'article suivant a été rédigé dans sa totalité par moi-même, Sophie HACHÉ, incluant la réalisation des expériences ainsi que des tests statistiques.

L'article suivant est présenté sous la forme exigée par l'université.

2.2 Article Scientifique

**ALTERATION OF CALCIUM HOMEOSTASIS IN PRIMARY PREECLAMPTIC
SYNCYTIOTROPHOBLASTS: EFFECT ON CALCIUM EXCHANGE IN
PLACENTA.**

¹Haché, S., ²Takser, L., ¹LeBellego, F., ³Weiler, H., ⁴Leduc, L., ⁵Forest, J.C., ⁵Giguère, Y,
⁴Masse, A. ¹Barbeau, B. and ^{1,*}Lafond, J

¹ Centre de recherche Biomed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Qc, H3C 3P8 Canada, ²Département d'Obstétrique-Gynécologie, Université de Sherbrooke, ⁵Dept. Biologie clinique, Université Laval.³ School of Dietetics and Human Nutrition, McGill University, 111 Lakeshore Road, Ste-Anne-de-Bellevue,⁴ Département d'Obstétrique-Gynécologie, Université de Montréal.

* Corresponding author: Julie Lafond :
Laboratoire de Physiologie Materno-Foetale,
Département des Sciences Biologiques
Centre de Recherche Biomed,
Université du Québec à Montréal. C.P. 8888, Succursale Centre-ville,
Montréal, Qc, Canada
H3C 3P8.
Fax: +1 514 987 6763
lafond.julie@uqam.ca

2.2.1 ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is characterized by maternal hypertension, proteinuria, oedema and, in 30% of cases, by intrauterine growth retardation (IUGR). Causes are still unknown; however, epidemiological and clinical studies have suggested alterations in maternal calcium metabolism. We hypothesized that in PE, calcium transport by the syncytiotrophoblast (ST) is disturbed. From total placental tissues, we studied the expression of: calcium channels (TRPV5, TRPV6 [transient receptor potential vanilloid]), calcium binding proteins (CaBP-9K, CaBP-28K), plasma membrane calcium ATPase pumps (PMCA1,2,3,4), ATP synthase, genes implicated in Ca^{2+} release (IP3R1,2,3; RyR1,2,3) and replenishment (SERCA1,2,3 [sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases]) from ER, channels implicated in mitochondrial Ca^{2+} accumulation (VDAC1,2,3 [voltage-dependent anion channels]) and a marker of oxidative stress (hOGG1 [Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1]), as well as the influence of these variations on calcium transport in primary ST cultures. The mRNA and protein levels were thereby examined by real-time PCR and Western blot analysis, respectively, in 2 different groups of pregnant women with similar gestational age: a normal group (n=16) and a PE group (n=8), diagnosed by a clinician. Our study showed a significant decrease in calcium transport by the ST cultured from preeclamptic placentas. We found a significant ($p < 0.05$) decrease in mRNA levels of TRPV5, TRPV6, CaBP-9K, CaBP-28K, PMCA1, PMCA4, ATP synthase, IP3R1, IP3R2, RyR1, RyR2 and RyR3 in PE group compared to normal one. We also noted a significant decrease in protein levels of TRPV5, TRPV6, CaBP-9K, CaBP-28K and PMCA1/4 in PE group. In contrast, SERCA1, SERCA2, SERCA3, VDAC3 and hOGG1 mRNA expressions were significantly increased in PE placentas. Conclusion: Calcium homeostasis and transport through placenta is compromised in preeclamptic pregnancies and it appears to be affected by a lack of ATP and an excess of oxidative stress.

Key words: calcium transport, calcium homeostasis, ATP, oxidative stress, placenta, preeclampsia, syncytiotrophoblast, trophoblast.

2.2.2 INTRODUCTION

Preeclampsia (PE) represents a major factor for maternal and perinatal morbidity and mortality (Sibai, Dekker et Kupferminc, 2005) and it affects 7-10% of pregnancies worldwide (Walker, 2000). PE is characterised by maternal syndromes such as gestational hypertension, proteinuria, oedema, and fetal syndromes like reduced amniotic fluid, abnormal oxygenation and, in 30% of cases, intrauterine growth retardation (IUGR). The precise factors involved in the pathogenesis of PE remain unclear and it is considered as a multisystem disorder (Sibai, Dekker et Kupferminc, 2005). PE is principally characterized by impaired placentation and would be the result of an impaired differentiation of villous trophoblasts, which leads to an abnormal remodelling of the spiral arteries (Huppertz, 2008). Diabetes, obesity, hypertension, renal disease, primiparity, maternal age, sperm and oocyte donation are all known predisposing factors for PE (Sibai, Dekker et Kupferminc, 2005). The oxidative stress, resulting from deficient remodelling of spiral arteries, is an important consequence of PE. It induces the placenta to release various factors, as inflammatory cytokines, apoptotic wastes and anti-angiogenic factors (Redman et Sargent, 2009). These secreted soluble factors are then thought to alter endothelial metabolic status, mitochondrial integrity and vascular functions (Robinson *et al.*, 2008). Oxidation of DNA bases by endogenously generated and environmental reactive oxygen species (ROS) leads to mutations. Guanine is particularly prone to oxidation by ROS. 8-Oxo-deoxyguanine (8-oxo-dG) is a quantitatively major form of oxidative DNA damage (Inoki *et al.*, 2002; Nishigori, Hattori et Toyokuni, 2004), inducing mainly G (guanine) to T (thymine) and A (adenine) to C (cytosine) substitutions (Fortini *et al.*, 2003). Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1 (hOGG1) is the main enzyme that excises 8-oxo-dG from damaged DNA via the base-excision repair pathway (Fortini *et al.*, 1999). It was suggested that cells under oxidative stress may require increased expression of hOGG1 to protect them from oxidative damage-induced mutations (Sheehan *et al.*, 2005). In addition, during PE, the oxidative stress exposes the placenta to fluctuating oxygen concentration (Kingdom et Kaufmann, 1999) and this periodic hypoxia will deplete placental cells from ATP. More precisely, it was observed that lower ATP levels in PE placental cells is due to an important change in expression of ATP

synthase gene (Hansson *et al.*, 2006), an important mitochondrial enzyme synthesizing ATP from ADP.

The most effective treatment for PE is delivery itself; however several randomized trials reported the effective use of various methods to reduce the rate or severity of PE (Sibai, Dekker et Kupferminc, 2005), such as calcium (Ca^{2+}) supplementation, but results showed minimum to no benefit. Several alterations in maternal Ca^{2+} homeostasis were identified in PE, such as low urinary Ca^{2+} excretion and low circulating level of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 , parathyroid hormone-related peptide and calcitonin gene related peptide (Halhali *et al.*, 2000; Seely *et al.*, 1992). Epidemiologic data suggest an inverse correlation between dietary Ca^{2+} uptake and incidence of hypertensive disorders of pregnancy in diverse populations (Hofmeyr, Duley et Atallah, 2007). Even if the results of two large clinical trials demonstrated disparity of the resulting benefits with respect to Ca^{2+} supplementation in prevention of PE (Belizan *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1997), Ca^{2+} supplementation did reduce PE risk in high risk pregnancies as well as for women with a low baseline dietary Ca^{2+} uptake (Askie *et al.*, 2007).

Ca^{2+} is a universal intracellular second messenger involved in many processes such as signal transduction, neurotransmission, enzyme and hormone secretion, cell cycle regulation and programmed cell death. It is a crucial element for adequate fetal development and prenatal programming of future diseases. Ca^{2+} is actively transported across the placenta at the rate of 140 mg/kg/day (Salle *et al.*, 1987) to reach about 25-30 mg of Ca^{2+} at term in the fetus. About 80% of the total fetal Ca^{2+} is accumulated during the last trimester of pregnancy (Givens et Macy, 1933). This Ca^{2+} transfer allows adequate fetal skeleton mineralization (Pitkin, 1983) and various cellular functions. There are two pathways for Ca^{2+} entry in the fetus. Paracellular diffusion, active in perfused placental cotyledons, enables Ca^{2+} to cross the placental barrier and represents 66 % of the total maternal fetal transfer (Stulc *et al.*, 1994). The second process involves transepithelial transport, which is mediated by the syncytiotrophoblast (ST). The syncytiotrophoblast is a polynucleated structure (Malassine et Cronier, 2002) formed during implantation and represents the most important maternal-fetal barrier (Rasmussen, 1986). The villous trophoblast cells are continuously incorporated, by syncytial fusion, into the ST. The ST is characterized by a brush border membrane facing

maternal circulation and a basal plasma membrane facing the fetal circulation. Besides transport, the multifunctional properties of the ST include absorption, exchanges and specific hormonal secretion such as human chorionic gonadotropin (hCG) and human placental lactogen (hPL). Cytotrophoblasts isolated from human term placenta undergo spontaneous ST-like morphological and biochemical differentiation *in vitro* and are thought to resemble *in vivo* ST (Kliman *et al.*, 1986). In a previous experiment, we quantified secretion of hCG, a well-known marker of this differentiation process for a period of 7 days (Kliman *et al.*, 1986), and interestingly, we observed that maximal hCG secretion was at day 4 of culture and paralleled the peak in Ca^{2+} transport (Moreau *et al.*, 2002). Intracellular Ca^{2+} signaling pathway can be briefly described as extracellular stimulations of tyrosine kinase and G-protein-coupled receptors launching cascade reactions leading to the production of the second messenger IP3 (inositol 1-4, 5-triphosphate) (Bezprozvanny, 2005; Mikoshiba, 2007). IP3 will bind to its receptor (IP3R) and Ca^{2+} will be released from the ER, triggering Ca^{2+} entry through the different plasma membrane store-operated channels. Ryanodine receptors (RyRs) are multimeric Ca^{2+} channels in the ER membrane, which also participate in the release of Ca^{2+} from the ER (Berridge, Bootman et Roderick, 2003; Bootman et Berridge, 1995). Ca^{2+} release from ER must be followed by Ca^{2+} replenishment via sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases (SERCAs) (East, 2000; Periasamy, Bhupathy et Babu, 2008). In addition, the mitochondria constitutes another Ca^{2+} storage organelle which can control the amplitude, length, localization and propagation of cytosolic Ca^{2+} elevations, and the Ca^{2+} recycling back to the ER. Ca^{2+} accumulation by the mitochondria implicates VDACs (voltage dependent anion channels) (Dulhunty *et al.*, 2006). Roles of VDACs and SERCAs are essential in maintaining a low resting intracellular Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Rhodes et Sanderson, 2009). The Ca^{2+} transepithelial transfer through the ST is a passive-active transport and requires various proteins. The Ca^{2+} diffuses from the maternal blood to the cytoplasmic compartment of the syncytium through specific channels named “transient receptor potential vanilloid” (TRPV) on the brush border membrane using the electrochemical gradient. Then, CaBPs bind Ca^{2+} and shuttle it to the fetal face of the ST where it is actively excreted by pumps (PMCA) (Belkacemi *et al.*, 2005; Belkacemi, Simoneau et Lafond, 2002). Ca^{2+} signaling pathways in the placenta are still under investigation and there is very little information concerning the expression of these proteins in PE placental tissues.

Because PE is potentially associated with an impaired maternal Ca^{2+} homeostasis, we hypothesized that transplacental Ca^{2+} exchange by ST is disturbed in PE. Our objectives were to: 1) characterize the placental Ca^{2+} transfer in PE; 2) identify altered gene expression of Ca^{2+} handling proteins involved in transplacental Ca^{2+} transport, such as Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6, CaBP-9K, CaBP-28K and PMCA1 to 4; 3) investigate Ca^{2+} intracellular signaling in PE placentas, involving ER and mitochondria, by studying the expression pattern of IP3Rs, RyRs, SERCAs and VDACs; and 4) to find what may be the cause of such changes in PE, as inadequate ATP and ROS levels.

2.2.3 MATERIALS AND METHODS

Placental tissues

Placental tissues were obtained from human placentas in accordance with the established guidelines of the ethical committee of St. Luc Hospital of the Centre Hospitalier Universitaire de Montréal and of Université du Québec à Montréal, (Montréal, QC, Canada). Placentas were obtained immediately after vaginal delivery, from normal term pregnancies (n=16) and from PE pregnancies (n=8). In order to avoid inter-ethnic variability of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and Ca^{2+} metabolism, only Caucasian women were invited to participate to this study. The sample contained women without pre-existing clinical risk factors of gestational hypertension. The following conditions were excluded from this study: pre-pregnancy diabetes mellitus, gestational diabetes, fetal physical or chromosomal abnormalities, untreated hypo/hyper thyroidism, tobacco and alcohol use, renal diseases with altered renal function, active and chronic liver disease, cancer, collagen diseases, congenital rickets and other malformations. The control group was represented by women without diagnosed pathologies, with no drugs intake. Preeclampsia was diagnosed by a clinician and classified according to strict criteria recommended by the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (von Dadelszen *et al.*, 2004): a systolic blood pressure of 140 mmHg or higher or a diastolic blood pressure of 90 mmHg or higher on two occasions at least four hours apart, occurring after 20 weeks of gestation in a pregnant women with previously normal blood pressure, and detectable proteinuria (≥ 0.3 g/24 h). This group also includes the late onset of PE characterized by the

late manifestation of PE and excludes pregnancy with IUGR, SGA (small for gestational age) fetus or HELLP (haemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) syndrome. Four of our PE patients were treated with magnesium sulphate (MgSO_4), safe for both mother and fetus (Omu *et al.*, 2008), which prevents seizures by altering membrane permeability and increasing seizure threshold (Yoder, Thornburg et Bisognano, 2009). Interestingly, MgSO_4 infusion caused significant increases in ionized Mg^{+2} levels, while serum ionized Ca^{2+} concentrations were unchanged (Aali *et al.*, 2007), suggesting that the effect of MgSO_4 is not exerted through modulations of ionized Ca^{2+} levels (Euser et Cipolla, 2009). Also, it was observed that in the normal pregnant women, ionized Ca^{2+} levels were higher in fetal blood and that this same condition was found in PE women treated with MgSO_4 (van der Heyden et Standley, 2002), suggesting that this treatment has no effect on Ca^{2+} transplacental transfer. Characteristics of pregnancies are summarized in Table 2.1. From the placentas, maternal and fetal membranes were removed and small pieces of tissue from several cotyledons (5-10) were collected to have a good representation of the total placenta (Mayhew, 2008). For RNA sample, tissues were embedded in RNA later stabilization reagent (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Tissue samples for protein extraction were directly frozen into liquid nitrogen and subsequently transferred into sterile tubes for storage at -80°C .

RNA extraction and cDNA synthesis

RNA was isolated from total placenta (30 mg) using RNeasy mini kit extraction columns (Qiagen) and reverse-transcribed. After RNA isolation, 1 μg of RNA was reverse transcribed into cDNA at 37°C for 1 hr using 10 μM poly(dT) (Roche Applied Science, Laval, Qc, Canada), 0.5 mM dNTP and 4 U of Omniscript reverse transcriptase (Omniscript RT kit) (Qiagen) in a 20 μl final volume. Exceptionally for the CaBP-28K gene, after reverse transcription, cDNA were first pre-amplified with the LightCycler RNA Pre-Amplification Kit (Roche Applied Science) before real-time PCR analyses.

Real-time PCR

Quantification of the mRNA coding for TRPV5, TRPV6, CaBP-9K, CaBP-28K, PMCA1, PMCA2, PMCA3 and PMCA4 was performed by real-time PCR using the Roche

LightCycler 480 PCR (Roche Applied Science). All primer sequences (Table 2.2) were generated through Primer3 Input (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), verified for specificity by BLAST analyses and designed to span from two different exons. PMCA2 and PMCA3 primers were purchased from Qiagen Inc. Real time PCR reactions were performed in a volume of 10 μ L containing 1 μ L of cDNA, 1 μ M of each primer and 5 μ L of SYBR Green I Master (Roche Applied Science). Quantification of the endogenous ribosomal gene HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) was performed to normalize variations in cDNA content among different samples. The expression of HPRT1 remained stable under our experimental conditions. Results were analyzed with the LightCycler 480 software version 1.5, and melting curves were used to verify the specificity of the amplified products. Quantification of PCR products was performed through a standard curve generated by simultaneously amplifying serial dilutions of the corresponding cDNA. Values obtained for each gene were normalized to HPRT1 in the same sample.

Western blots analysis

Tissues were initially washed with lymphocyte lysis buffer containing 1.7 mM Tris-HCl (pH 7.3), 1.44 mM NH_4Cl and protease inhibitor cocktail in tablets and then proteins were purified by the addition of the extraction buffer containing 125 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM CaCl_2 , 1.4% Triton X-100 (v/v) and protease inhibitor cocktail in tablets (Roche Applied Science). Protein concentrations were evaluated with BCA (bicinchoninic acid) assay (Pierce, Brockville, ON, Canada). Cellular proteins (100 μ g) were solubilized in Laemmli buffer and denatured by heating at 95°C for 5 min. Lysates were resolved in 10% SDS-PAGE and proteins were electro-blotted on a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Cambridge, Ontario, Canada) at 17V for 30 min. Membranes were blocked for 1 hr at room temperature in TBS-T (20 mM Tris (pH 7.6), 137 mM NaCl and 0.1% Tween-20) containing 5% skimmed milk. Membranes were then incubated with the appropriate primary antibody (see Table 2.3 for details on antibodies) in TBS-T–3% BSA overnight at 4°C, washed three times with TBS-T and probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 hrs at room temperature. Blots were washed three times with TBS-T and the detection was performed using the BM Chemiluminescence (POD) system (Roche Applied Science) and visualized on Kodak™ X-Omat™ Blue XB-1 autoradiography films from Perkin Elmer.

(Waltham, MA, USA). PVDF membranes were stripped with a stripping solution containing 25mM glycine-HCl (pH 2) and 1% SDS at room temperature for 10 min, rinsed twice with PBS (10 mM sodium phosphate (pH 7.2) and 0.9% NaCl) and blocked for 1 hr before reprobing with another antibody. Precisely, we loaded 8 samples/gel (eight normal + eight PE) and transferred two gels/membrane. After exposure, membranes were stained with Amido Black Staining Solution (Sigma) to correct variations in protein content among samples. Densitometric analysis of band intensities was made with QuantityOne (Biorad) software and results were normalized with protein content obtained by Amido Black.

Cell cultures

For Ca^{2+} transport assay, primary cytotrophoblast cells were prepared from placentas obtained immediately after vaginal delivery, from normal term pregnancies (n=5) and from PE pregnancies (n=4) (see characteristics in Table 2.1). Cytotrophoblast cells were isolated using the trypsin (Sigma, Oakville, ON, Canada)-DNase (Roche Applied Science)/Percoll (Sigma) method as described by Kliman *et al.* (Kliman *et al.*, 1986), with some modifications (Daoud *et al.*, 2005). Following cell isolation, cytotrophoblast cells were seeded at a density of 1.5×10^6 cells per well in 24-well plate (Corning, Acton, USA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose) (DMEM-HG) (Sigma) containing 10% FBS (Cansera International Inc, Etobicoke, ON, Canada), 2 mM glutamine (Gibco-Invitrogen, Burlington, ON, Canada), 25 mM HEPES (Sigma) and PSN, a penicillin-streptomycin-neomycin antibiotic mixture (Gibco-Invitrogen). The medium was refreshed daily. The purity of the cytotrophoblast cell preparation was evaluated by flow cytometry using FITC-conjugated monoclonal antibody against cytokeratin-7 as previously described (Daoud *et al.*, 2005).

MTT Assay

The cells viability was measured by the MTT assay (Sigma). Cells were cultured with DMEM-HG without phenol red and were incubated with 100 μ L MTT per well each day. Plates were incubated for 1 hr at 37°C and 200 μ L of DMSO were added to each well. After mixing,, the optical density was measured at 570nm.

Ca²⁺ transport assay

Ca²⁺ transport studies were performed on trophoblast cells after 4 days of culture. Briefly, cells were washed twice with the Ca²⁺ uptake buffer (HBSS (Hanks' balanced salt solution from Sigma) containing 1.26 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, and 0.1% BSA (Bovine serum albumin from Roche Applied Science)) and allowed to equilibrate in the same buffer (250 µl) for 10 min. Thereafter, cells were incubated at 37°C for different intervals of time after the addition of 250 µl of uptake buffer containing ⁴⁵CaCl₂ (5 µCi/well) (MP Biomedicals, Inc, Irvine, CA, USA). The incubation was stopped by aspiration of the uptake buffer. The cells were washed three times with 1 ml of ice-cold PBS containing 4 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) (to eliminate the nonspecific component of the uptake), then solubilized in 0.1 M NaOH. The cell-associated radioactivity was measured by a β-scintillation 1400 Wallace counter. The cellular proteins content of each well was evaluated by spectrophotometric quantification, using the BCA assay. The Ca²⁺ transport is expressed as nmole of Ca²⁺ (from specific activity) per milligram of cellular proteins.

Statistical Analyses

Data were expressed as the mean ± S.E.M. and were analyzed using GraphPad Prism software for windows, version 5.0. One-way ANOVA followed by the Tukey's test was used to analyze Ca²⁺ transport and nonparametric Mann-Whitney U test was used to determine differences in mRNA and protein levels between normal and PE placentas. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

2.2.4 RESULTS

Ca²⁺ transport is less efficient in ST from PE placentas than in normal ST

To assess whether Ca²⁺ homeostasis is affected in PE, we first examined the Ca²⁺ transport in primary ST, obtained from normal and PE placentas. The Ca²⁺ transport assay was performed by means of a radioactive form of calcium (⁴⁵CaCl₂) for different time intervals (10, 20, 30, 40, 50 sec., 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 min.). As we described earlier, isolated trophoblasts undergo morphological changes during culture to form the functional multinucleated syncytium, which is properly developed after 96 hrs of culture (Kliman *et al.*, 1986; Malassine et Cronier, 2002). Therefore, we measured the cell-associated radioactivity after 4 days of culture, based on β -scintillation. The Ca²⁺ transport was expressed as nmole of Ca²⁺ (from specific activity) per milligram of cellular proteins. The Ca²⁺ uptake from normal and PE ST is rapid and there is no difference during the first 2 min with an initial velocity (V_i) of 4.39 ± 0.73 nmol/mg/min for PE and 5.38 ± 1.04 nmol/mg/min for normal group. Then, the Ca²⁺ transport reaches a plateau, which represent a balance between the Ca²⁺ entry and exit, showing a decrease of 60% in PE group (3.75 ± 0.31 nmol/mg protein) compared to normal group (8.99 ± 0.48 nmol/mg protein) at 10, 20 and 30 min. The plateau is reached earlier for the PE group (after 2 min of treatment) than for the normal group (after 10 min of treatment). The plateau is generally known to reflect cells Ca²⁺ entry and exit (Fig. 2.1 a). To make sure that the Ca²⁺ transport in PE cultures was not affected by a probable higher rate of apoptosis, we measured the cells viability in the two cellular populations and there was no difference between normal and PE trophoblast cells (Fig. 2.1 b). These observations suggest strongly that in PE, Ca²⁺ transfer by ST is compromised.

To study whether the decreased Ca²⁺ transport in placentas from PE women is due to a decrease of Ca²⁺-handling protein in ST, we extracted mRNA and proteins from total placental tissues and we compared the changes in protein and mRNA levels, by Western blot and real-time PCR, of several genes implicated in placental Ca²⁺ transport in normal and PE placentas.

TRPV5 and TRPV6 expression is decreased in PE

To establish if the entry of Ca^{2+} in the placenta is disturbed during PE, we examined the protein and mRNA expression of TRPV5 and TRPV6, gatekeepers of Ca^{2+} transport. We found that the protein expression of TRPV5 was significantly decreased in PE compared to normal placental tissues (Fig. 2.2 a), as its mRNA expression (Fig. 2.2 b). Similarly, TRPV6 protein and mRNA expression decreases in PE compared to normal group (Fig. 2.2 c, d). These findings suggest that the decrease in the Ca^{2+} transport in ST is partially due to an impaired entrance in the placenta.

CaBP-9K and CaBP-28K expression is decreased in PE

Immediately after its penetration in the ST, Ca^{2+} moves toward the fetal side, where it is extruded, or it is buffered to avoid reaching lethal concentration for the cell. Those tasks are accomplished by calcium binding proteins, as CaBP-9K and CaBP-28K. To verify if this system is altered in PE, we analysed their protein and mRNA expression. We found that the protein expression of CaBP-9K is decreased in the PE placental tissue compared to normal ones (Fig. 2.3 a) as well as mRNA expression (Fig. 2.3 b). For the gene CaBP-28K, the protein and mRNA expression is also decreased in PE placentas (Fig. 2.3 c, d). These observations suggest that Ca^{2+} buffering is altered in PE placental cells.

PMCA expression is decreased in PE

Once arrived on the other side of the cell, Ca^{2+} has to cross over a last membrane to reach the fetal circulation. This expulsion is mainly achieved by the ATPase pumps PMCA, which respond to fetal specific needs in Ca^{2+} . To determine if an impaired Ca^{2+} exit from ST could be responsible for the impaired placental transfer seen in Fig. 1, we studied protein and mRNA levels of 4 isoforms of PMCA (PMCA1-4). For the protein expression, we used an antibody that detects PMCA1 and PMCA4 together. Thus, we observed that the protein expression of PMCA 1/4 (Fig. 2.4 a) decreases significantly in PE compared to normal group. We observed a similar pattern for PMCA1 and PMCA4 mRNA expression (Fig. 2.4 b, c). In contrast, PMCA2 and PMCA3 mRNA expressions show no variation (data not shown).

Collectively, these findings indicate that the Ca^{2+} extrusion towards the fetal side is compromised in PE.

ATP synthase level is decreased in PE

PMCA is an ATPase pump, thus they need ATP to function properly. As it was observed that lower ATP levels in PE placental cells is due to an important change in expression of ATP synthase gene (Hansson *et al.*, 2006), we wanted to verify if that phenomenon was present in our tissue samples and if it could be the cause of the reduction of PMCA. Therefore, we analysed mRNA levels of the mitochondrial ATP synthase gene in normal and PE placental tissues (Fig. 2.5). We observed that its mRNA expression was drastically decreased in PE compared to normal. This result suggests, as we hypothesised, that depletion of ATP by hypoxia affects PMCA expression in PE tissues.

Ca^{2+} intracellular signaling implicating mitochondria and ER is altered in PE

Following the decrease of CaBPs (Fig. 2.3) and PMCA (Fig. 2.4) expressions, respectively responsible for Ca^{2+} buffering and extrusion, we hypothesized that placental cells may suffer of Ca^{2+} overload. Therefore, we analyzed the mRNA expression of IP3R and RyR, molecules in charge of the Ca^{2+} release from the ER, increasing Ca^{2+} intracellular concentration. As we show in Fig. 2.6 and Fig. 2.7, IP3R and RyR mRNA expressions are decreased in PE placentas compared to normal ones. In parallel, we also analysed mRNA expression of SERCA, transferring Ca^{2+} from the cytosol of the cell to the lumen of the ER, to see if it responded to that impending Ca^{2+} overload by diminishing $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Unsurprisingly, we obtained an increase in mRNA of SERCA gene in PE placentas (Fig. 2.8). Likewise, the mitochondria is another important organelle that stores Ca^{2+} and as its replenishment implicates VDAC gene, we analyzed its mRNA expression and also observed a significant increase in PE placentas (Fig. 2.9). These results support our hypothesis about the alteration of intracellular Ca^{2+} signaling in placentas with PE, more precisely of Ca^{2+} overload.

Presence of high hOGG1 mRNA expression: PE placentas undergo severe oxidative stress

hOGG1 is an enzyme repairing DNA oxidation damages by excising oxidized-guanine. As the presence of elevated levels of hOGG1 correlates with elevated ROS levels, we analyzed its mRNA expression to determine, as we hypothesized, if PE placentas are more affected by oxidative stress than normal ones. Interestingly, we observed a huge increase of hOGG1 mRNA expression in PE placentas (Fig. 2.10). This result confirms that in PE, placental cells suffer from severe oxidative stress, which surely alters many cellular mechanisms, as Ca^{2+} signaling.

2.2.5 DISCUSSION

In this study, we demonstrated for the first time a significant decrease in Ca^{2+} transport in primary cultures of ST from PE placentas compared to uncomplicated ones. As we show in Fig. 2.1, Ca^{2+} transport is about 60% lower in primary PE syncytiotrophoblast cells than in normal. Earlier, we and others demonstrated that, after 4 days of culture, there was a significant reduction of 40% in cell fusion in trophoblasts isolated from PE placentas when compared to trophoblasts obtained from normal patients (unpublished data). Thus, the decrease in Ca^{2+} transport from ST is only partially due to the 40% reduction of syncytial volume seen in primary ST from PE (unpublished data). To explain what may also be responsible for the altered Ca^{2+} transfer and to clarify the mechanism involved, we investigated the expression of different proteins involved in Ca^{2+} homeostasis in placentas from PE pregnancies. Until now, there is no information on the variation of the Ca^{2+} handling proteins and the Ca^{2+} transfer in PE placentas. Importantly, for the first time, we successfully quantified the placental mRNA expression of CaBP-28K by real-time PCR. Herein, we demonstrated that the Ca^{2+} homeostasis is perturbed in PE placentas, most likely caused by a high oxidative stress level and lack of ATP.

Decreased expression of TRPVs is accompanied with a decreased expression of CaBPs

A recent study shown that the Ca^{2+} concentration in fetal blood and amniotic fluid is significantly lower in murine TRPV6 knockout (KO) fetuses than in wild-types (Suzuki *et al.*, 2008). The same team also demonstrated that the transport activity of radioactive Ca^{2+} ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) from mother to fetuses was 40% lower in TRPV6 KO fetuses than in wildtypes, that TRPV6 and CaBP-9K co-localized in the yolk sac and that CaBP-9K mRNA expression was decreased in TRPV6 KO mice placentas (Suzuki *et al.*, 2008). Also, TRPV6 expression has been shown to increase with the induction of CaBP-9K (Peng, Brown et Hediger, 2003). These data suggest an important role for the TRPV6 channel in Ca^{2+} homeostasis and placental transfer, and suggest that TRPV6 and CaBP-9K are cooperatively involved in maternal-fetal Ca^{2+} transport. This matches with our results, as we obtained a decrease in transport of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in ST from PE placentas (Fig. 2.1 a), accompanied by a decrease of TRPV6 (Fig.2.2 d) and CaBP-9K (Fig. 2.3 b) protein and mRNA expression. Mice TRPV5

KO have shown a defective Ca^{2+} homeostasis, limited Ca^{2+} transfer to the fetus, as well as a CaBP-28K mRNA down regulation (Hoenderop *et al.*, 2003). Moreover, a previous report showed that CaBP-28K translocates towards the plasma membrane and directly associates with TRPV5, facilitating high Ca^{2+} transport rates by preventing channel inactivation (Lambers *et al.*, 2006). In our study, we also observed a decreased mRNA and protein expression of TRPV5 (Fig.2.2 a, b) accompanied by a decreased mRNA and protein expression of CaBP-28K (Fig. 2.3 c, d). It has been demonstrated that TRPV5 and TRPV6 are considered as gatekeepers of transcellular Ca^{2+} transport as they are inversely correlated with the intracellular Ca^{2+} concentration (Nijenhuis, Hoenderop et Bindels, 2005). Effectively, it was demonstrated that in condition of high Ca^{2+} concentration, both TRPV5 and TRPV6 exhibit calcium-dependant inactivation to avoid elevation in intracellular Ca^{2+} to toxic levels (Peng, Brown et Hediger, 2003). This is the first time that the correlation of the expression of TRPVs with CaBPs is observed in human placentas, suggesting a fundamental role of CaBPs in the regulation of TRPVs. Moreover, it has also been demonstrated that CaBP-28K binds to the amino and carboxyl end of both TRPV5 and TRPV6 in low Ca^{2+} concentration and that the disruption of this association results in a decrease of Ca^{2+} buffering at the entry gate, followed by impairment of transcellular Ca^{2+} transport (Lambers *et al.*, 2006). Finally, a synchronized rise in the expression of both TRPV5/TRPV6 and intracellular calcium-binding proteins (CaBP-9K/28K) is essential to achieve maximal Ca^{2+} influx at the apical side, which seems to be deficient in placentas with PE.

PE placentas demonstrate a decreased expression of PMCA1 and 4 as well as a decrease of ATP synthase and an increase of hOGG1 genes expression.

In Ca^{2+} transport, the importance of CaBPs is also highlighted by its co-expression with PMCA1 (Lambers *et al.*, 2006). In human placentas, PMCA1 are the principal proteins implicated in Ca^{2+} extrusion to the fetal side from the ST. Their function is to eliminate intracellular Ca^{2+} in excess, and, at a resting state, maintain cytosolic Ca^{2+} concentration to prevent toxic surcharge (Lafond et Simoneau, 2006). To be functional, PMCA1 need the presence of ATP. It was shown that ATP level in PE placental cells is lower due to an important change in ATP synthase gene (Hansson *et al.*, 2006) and we demonstrated that the ATP synthase level in our tissue samples was significantly decreased in PE (Fig. 2.5).

Moreover, it was shown that changes in PMCA expression was correlated with its activity and ATP content in rat cells (Nabekura *et al.*, 2004). This agrees with our results where we observed a significant decrease in mRNA and protein expression of PMCA1 and 4 (Fig. 2.4). This lack of ATP is possibly attributed to hypoxia in PE placenta, caused by oxidative stress, which would deplete cellular ATP. To determine if there was a real increased of ROS in our samples, we analyzed the mRNA expression of hOGG1, a marker of oxidative stress. Effectively, mRNA expression on hOGG1 is extremely higher in PE placental tissue than in normal (Fig. 2.10). Indeed, oxidative stress, resulting of deficient spiral artery remodelling, is an element of PE acting as a key intermediary event in the pathology (Cindrova-Davies, 2009). Thus, based on the reduced mRNA and protein expression of PMCA1 and 4 in PE placentas, we suggest that this could result in inefficient Ca^{2+} exclusion from ST by PMCA. Moreover, the oxidative stress in PE placenta promotes the formation of lipids peroxides, which alter cell membranes, where, as we known, are located the PMCA (Cindrova-Davies, 2009). It was recently demonstrated the PMCA activity is very sensitive to the level of lipid peroxidation of the plasma membrane (Marin *et al.*, 2008) and that the reduced activity of PMCA in PE placentas could not be associated with a defective enzyme but rather with a high level of lipid peroxidation (Oviedo *et al.*, 2006). It also has been demonstrated that oxidative stress induces a Ca^{2+} overload response and inhibition of PMCA in rat pancreatic cells (Bruce et Elliott, 2007). A recent study indicated that the inhibitory effect of both oxidative stress and mitochondrial inhibitors on PMCA activity was explained by ATP depletion due to the inhibition of mitochondria (Baggaley, Elliott et Bruce, 2008). That information could suggest that PMCA are negatively affected by the depletion of ATP caused by oxidative stress in PE, which in consequence will increase the intracellular Ca^{2+} concentration. This rise in Ca^{2+} content could affect mitochondria and contribute to the rise of apoptotic events, accentuating the ATP depletion.

Avoiding Ca^{2+} overload by the action of ER and mitochondria

Besides the action of CaBPs, the major mechanisms known to avoid excessive Ca^{2+} concentrations in the cell are the buffering action of the ER and the mitochondria. It is well known that ER, a specialized Ca^{2+} store organelle, is intimately involved in regulating Ca^{2+} movements within cells. IP3Rs and RyRs participate in the release of Ca^{2+} from the ER

(Berridge, Bootman et Roderick, 2003; Bootman et Berridge, 1995) and we observed that the mRNA expression of IP3R1,2 (Fig. 2.6) and RyR1,2,3 (Fig. 2.7) was decreased in PE placentas. Thus, we suggest that this decrease is a consequence of elevated $[Ca^{2+}]_i$. In contrast, we observed that SERCA1,2,3 (Fig. 2.8) mRNA expression was increased in PE placenta, which functions to pump Ca^{2+} from the cytosol into the ER store. Its action, in combination with Ca^{2+} efflux mechanisms, is essential in maintaining a low resting $[Ca^{2+}]_i$ (Rhodes et Sanderson, 2009). In parallel, we also observed that the mRNA expression of VDCA3 (Fig. 2.9), channel implicated in mitochondrial Ca^{2+} accumulation, increased in PE placentas.

In conclusion, the important finding of this study is the alteration of the Ca^{2+} transfer in PE placentas compared with normal placentas. Another important finding in this work was the successful quantification of the CaBP-28K mRNA by real time PCR. Based on our results and recent works, we can hypothesize that oxidative stress in PE is a determinant factor affecting Ca^{2+} transfer in ST. As we demonstrated, the decrease of PMCA expression could be attributed to the ATP depletion, probably caused by oxidative stress, and in consequence, elevates intracellular Ca^{2+} concentration, which in turn down-regulates CaBPs, TRPVs. We also propose that IP3Rs and RyRs expression decrease, while SERCAs and VDCA3s increase in order to avoid a Ca^{2+} overload. In perspectives, as placental insufficiency could lead to IUGR in 30% of the cases (Walker, 2000), which is associated with lower cord blood Ca^{2+} concentration (Elizabeth, Krishnan et Vijayakumar, 2008), it could be interesting to compare the mechanisms of Ca^{2+} transfer in PE placentas with or without IUGR. Working on strategies to protect placentas against reduced expression of PMCA may be very useful to weaken symptoms related to oxidative stress and intracellular Ca^{2+} overload, and to enhance Ca^{2+} transfer to the fetus. By elucidating factors involved in the placenta Ca^{2+} transport in pregnancy, we will be able to determine one of the possible mechanisms responsible for fetal predisposition to adult diseases related to PE. This fundamental approach will not have an immediate impact in clinical practice, but it will help to characterize the Ca^{2+} transfer process from mother to fetus in these pregnancies and evaluate if ultimately it will be possible to improve antenatal placental transfer using nutritional intervention, pharmacological or hormonal agents. This project is the first step of a project of great magnitude. Future studies

are needed to investigate the mechanism of placental Ca^{2+} transport in PE and in several years, we shall perhaps be able to intervene to develop strategies before birth to improve fetal and neonatal health using nutritional, pharmacological or hormonal intervention.

2.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

FLB was supported by a Strategic Training Initiative in Research in Reproductive Health Sciences (STIRRHs) fellowship. This research was granted by Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

2.2.7 REFERENCES

- Aali, S., Khazaeli, P., Ghasemi, F. et Mehdizadeh, A. (2007). "Serum magnesium and calcium ions in patients with severe pre-eclampsia/eclampsia undergoing magnesium sulfate therapy." Med Sci Monit **13**(4): CR191-4.
- Askie, L. M., Duley, L., Henderson-Smart, D. J. et Stewart, L. A. (2007). "Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data." Lancet **369**(9575): 1791-8.
- Baggaley, E. M., Elliott, A. C. et Bruce, J. I. (2008). "Oxidant-induced inhibition of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in pancreatic acinar cells: role of the mitochondria." Am J Physiol Cell Physiol **295**(5): C1247-60.
- Belizan, J. M., Villar, J., Gonzalez, L., Campodonico, L. et Bergel, E. (1991). "Calcium supplementation to prevent hypertensive disorders of pregnancy." N Engl J Med **325**(20): 1399-405.
- Belkacemi, L., Bedard, I., Simoneau, L. et Lafond, J. (2005). "Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review." Cell Calcium **37**(1): 1-8.
- Belkacemi, L., Simoneau, L. et Lafond, J. (2002). "Calcium-binding proteins: distribution and implication in mammalian placenta." Endocrine **19**(1): 57-64.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. et Roderick, H. L. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.
- Bezprozvanny, I. (2005). "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." Cell Calcium **38**(3-4): 261-72.
- Bootman, M. D. et Berridge, M. J. (1995). "The elemental principles of calcium signaling." Cell **83**(5): 675-8.
- Bruce, J. I. et Elliott, A. C. (2007). "Oxidant-impaired intracellular Ca²⁺ signaling in pancreatic acinar cells: role of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase." Am J Physiol Cell Physiol **293**(3): C938-50.
- Cindrova-Davies, T. (2009). "Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction." Placenta **30**: S55-65.
- Daoud, G., Simoneau, L., Masse, A., Rassart, E. et Lafond, J. (2005). "Expression of cFABP and PPAR in trophoblast cells: effect of PPAR ligands on linoleic acid uptake and differentiation." Biochim Biophys Acta **1687**(1-3): 181-94.
- Dulhunty, A. F., Beard, N. A., Pouliquin, P. et Kimura, T. (2006). "Novel regulators of RyR Ca²⁺ release channels: insight into molecular changes in genetically-linked myopathies." J Muscle Res Cell Motil **27**(5-7): 351-65.
- East, J. M. (2000). "Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure/function and biology (review)." Mol Membr Biol **17**(4): 189-200.
- Elizabeth, K. E., Krishnan, V. et Vijayakumar, T. (2008). "Umbilical cord blood nutrients in low birth weight babies in relation to birth weight & gestational age." Indian J Med Res **128**(2): 128-33.

- Euser, A. G. et Cipolla, M. J. (2009). "Magnesium sulfate for the treatment of eclampsia: a brief review." *Stroke* **40**(4): 1169-75.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O. M., Laval, J. et Dogliotti, E. (1999). "The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells." *J Biol Chem* **274**(21): 15230-6.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V. et Dogliotti, E. (2003). "8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways." *Mutat Res* **531**(1-2): 127-39.
- Givens, M. H. et Macy, I. C. (1933). "The chemical composition of the human fetus." *J Biol Chem* **102**: 7-17.
- Halhali, A., Tovar, A. R., Torres, N., Bourges, H., Garabedian, M. et Larrea, F. (2000). "Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(5): 1828-33.
- Hansson, S. R., Chen, Y., Brodzski, J., Chen, M., Hernandez-Andrade, E., Inman, J. M., Kozhich, O. A., Larsson, I., Marsal, K., Medstrand, P., Xiang, C. C. et Brownstein, M. J. (2006). "Gene expression profiling of human placentas from preeclamptic and normotensive pregnancies." *Mol Hum Reprod* **12**(3): 169-79.
- Hoenderop, J. G., van Leeuwen, J. P., van der Eerden, B. C., Kersten, F. F., van der Kemp, A. W., Merillat, A. M., Waarsing, J. H., Rossier, B. C., Vallon, V., Hummler, E. et Bindels, R. J. (2003). "Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5." *J Clin Invest* **112**(12): 1906-14.
- Hofmeyr, G. J., Duley, L. et Atallah, A. (2007). "Dietary calcium supplementation for prevention of pre-eclampsia and related problems: a systematic review and commentary." *BJOG* **114**(8): 933-43.
- Huppertz, B. (2008). "Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis." *Hypertension* **51**(4): 970-5.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. et Guan, K. L. (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." *Nat Cell Biol* **4**(9): 648-57.
- Kingdom, J. C. et Kaufmann, P. (1999). "Oxygen and placental vascular development." *Adv Exp Med Biol* **474**: 259-75.
- Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M. et Strauss, J. F., 3rd (1986). "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae." *Endocrinology* **118**(4): 1567-82.
- Lafond, J. et Simoneau, L. (2006). "Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins." *Int Rev Cytol* **250**: 109-74.
- Lambers, T. T., Mahieu, F., Oancea, E., Hoofd, L., de Lange, F., Mensenkamp, A. R., Voets, T., Nilius, B., Clapham, D. E., Hoenderop, J. G. et Bindels, R. J. (2006). "Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca²⁺ transport." *EMBO J* **25**(13): 2978-88.
- Levine, R. J., Hauth, J. C., Curet, L. B., Sibai, B. M., Catalano, P. M., Morris, C. D., DerSimonian, R., Esterlitz, J. R., Raymond, E. G., Bild, D. E., Clemens, J. D. et Cutler, J. A. (1997). "Trial of calcium to prevent preeclampsia." *N Engl J Med* **337**(2): 69-76.
- Malassine, A. et Cronier, L. (2002). "Hormones and human trophoblast differentiation: a review." *Endocrine* **19**(1): 3-11.

- Marin, R., Riquelme, G., Godoy, V., Diaz, P., Abad, C., Caires, R., Proverbio, T., Pinero, S. et Proverbio, F. (2008). "Functional and structural demonstration of the presence of Ca-ATPase (PMCA) in both microvillous and basal plasma membranes from syncytiotrophoblast of human term placenta." Placenta **29**(8): 671-9.
- Mayhew, T. M. (2008). "Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies." Placenta **29**(1): 1-14.
- Mikoshiba, K. (2007). "IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts." J Neurochem **102**(5): 1426-46.
- Moreau, R., Hamel, A., Daoud, G., Simoneau, L. et Lafond, J. (2002). "Expression of calcium channels along the differentiation of cultured trophoblast cells from human term placenta." Biol Reprod **67**(5): 1473-9.
- Nabekura, T., Tomohiro, M., Ito, Y. et Kitagawa, S. (2004). "Changes in plasma membrane Ca²⁺-ATPase expression and ATP content in lenses of hereditary cataract UPL rats." Toxicology **197**(2): 177-83.
- Nijenhuis, T., Hoenderop, J. G. et Bindels, R. J. (2005). "TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate." Pflugers Arch **451**(1): 181-92.
- Nishigori, C., Hattori, Y. et Toyokuni, S. (2004). "Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis." Antioxid Redox Signal **6**(3): 561-70.
- Omu, A. E., Al-Harmi, J., Vedi, H. L., Mlechko, L., Sayed, A. F. et Al-Ragum, N. S. (2008). "Magnesium sulphate therapy in women with pre-eclampsia and eclampsia in Kuwait." Med Princ Pract **17**(3): 227-32.
- Oviedo, N. J., Benaim, G., Cervino, V., Proverbio, T., Proverbio, F. et Marin, R. (2006). "The plasma membrane Ca²⁺-ATPase protein from red blood cells is not modified in preeclampsia." Biochim Biophys Acta **1762**(3): 381-5.
- Peng, J. B., Brown, E. M. et Hediger, M. A. (2003). "Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond." J Physiol **551**(Pt 3): 729-40.
- Periasamy, M., Bhupathy, P. et Babu, G. J. (2008). "Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology." Cardiovasc Res **77**(2): 265-73.
- Pitkin, R. M. (1983). "Endocrine regulation of calcium homeostasis during pregnancy." Clin Perinatol **10**(3): 575-92.
- Rasmussen, H. (1986). "The calcium messenger system (2)." N Engl J Med **314**(18): 1164-70.
- Redman, C. W. et Sargent, I. L. (2009). "Placental stress and pre-eclampsia: a revised view." Placenta **30**: S38-42.
- Rhodes, J. D. et Sanderson, J. (2009). "The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens." Exp Eye Res **88**(2): 226-34.
- Robinson, N. J., Wareing, M., Hudson, N. K., Blankley, R. T., Baker, P. N., Aplin, J. D. et Crocker, I. P. (2008). "Oxygen and the liberation of placental factors responsible for vascular compromise." Lab Invest **88**(3): 293-305.
- Salle, B. L., Senterre, J., Glorieux, F. H., Delvin, E. E. et Putet, G. (1987). "Vitamin D metabolism in preterm infants." Biol Neonate **52**: 119-30.
- Seely, E. W., Wood, R. J., Brown, E. M. et Graves, S. W. (1992). "Lower serum ionized calcium and abnormal calciotropic hormone levels in preeclampsia." J Clin Endocrinol Metab **74**(6): 1436-40.

- Sheehan, A. M., McGregor, D. K., Patel, A., Shidham, V., Fan, C. Y. et Chang, C. C. (2005). "Expression of human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) in follicular lymphoma." Mod Pathol **18**(11): 1512-8.
- Sibai, B., Dekker, G. et Kupferminc, M. (2005). "Pre-eclampsia." Lancet **365**(9461): 785-99.
- Stulc, J., Stulcova, B., Smid, M. et Sach, I. (1994). "Parallel mechanisms of Ca⁺⁺ transfer across the perfused human placental cotyledon." Am J Obstet Gynecol **170**(1 Pt 1): 162-7.
- Suzuki, Y., Kovacs, C. S., Takanaga, H., Peng, J. B., Landowski, C. P. et Hediger, M. A. (2008). "Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport." J Bone Miner Res **23**(8): 1249-56.
- van der Heyden, J. J. et Standley, C. A. (2002). "Maternal-fetal effects of magnesium sulfate on serum osmolality in pre-eclampsia." J Matern Fetal Neonatal Med **11**(4): 270-4.
- von Dadelszen, P., Magee, L. A., Devarakonda, R. M., Hamilton, T., Ainsworth, L. M., Yin, R., Norena, M., Walley, K. R., Gruslin, A., Moutquin, J. M., Lee, S. K. et Russell, J. A. (2004). "The prediction of adverse maternal outcomes in preeclampsia." J Obstet Gynaecol Can **26**(10): 871-9.
- Walker, J. J. (2000). "Pre-eclampsia." Lancet **356**(9237): 1260-5.
- Yoder, S. R., Thornburg, L. L. et Bisognano, J. D. (2009). "Hypertension in pregnancy and women of childbearing age." Am J Med **122**(10): 890-5.

2.2.8 TABLES

Table 2.1

Clinical characteristics of mothers and babies

| Characteristics | Normal group (n= 16) | PE group (n= 8) |
|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Maternal age (years) | 33.7 (± 5) | 34 (± 4) |
| Gestational age (weeks) | 37.9 ($\pm 1,7$) | 36.7 (± 2) |
| Body Mass Index (Kg/m ²) | 21.2 (± 3) | 26.9(± 4) |
| Placental weight (g) | 533 (± 115) | 518 (± 130) |
| Babies birth weight (Kg) | 3,1 ($\pm 0,36$) | 2,9 ($\pm 0,5$) |
| Mode of delivery | Vaginal | Vaginal |
| Smoking | No | No |

Table 2.2
Real-Time PCR primer sequences

| Gene | Primer Sequence | Product size (bp) |
|----------|--|-------------------|
| | Sense Antisense | |
| CaBP-9k | 5' ATA TGC AGC CAA AGA AGG TG 3' 5' TGG ACC TTT GAG TAA ACT GGG 3' | 94 |
| CaBP-28k | 5' TCA GGA CGG CAA TGG ATA CA 3' 5' AAG AGC AAG ATC CGT TCG GT 3' | 166 |
| TRPV5 | 5' AGA CAA GGA GGA TGA CCA GGA 3' 5' CCC AGG GTG TTT TGA CGA AG 3' | 168 |
| TRPV6 | 5' TCT GCG GAC GGG AGT ATG G 3' 5' CCT GTG CGT AGC GTT GGA T 3' | 96 |
| PMCA1 | 5' CAG CAG GAG AAC CAG AAC CA 3' 5' ATT CCA GCC CTC TGA CAC TT 3' | 139 |
| PMCA2 | Hs_ATP2B2_1_SG QuantiTect Primer Assay (Quiagen) | 220 |
| PMCA3 | Hs_ATP2B3_1_SG QuantiTect Primer Assay (Quiagen) | 149 |
| PMCA4 | 5' TCAGGAATCCCAACGGTG 3' 5' TCGATGACAGTGCGTACC3' | 148 |
| ATPase | 5' CGC CAC CCT AGC AAT ATC AA 3' 5' TTA AGG CGA CAG CGA TTT CT 3' | 98 |
| IP3R1 | 5' TGA CGA GAA CCT GCC CTA T 3' 5' TCC TTT CGC CAT CTT GCT 3' | 430 |
| IP3R2 | 5' GCA ATC GTG TCT GTT CCA 3' 5' TCT TCA AGT CTC AGC ATC G 3' | 332 |
| IP3R3 | 5' GCC TAC TAT GAG AAC CAC ACG 3' 5' CAG AAG AGC AAT GAG ATG AGA G 3' | 389 |
| RyR1 | 5' TGA CTA CCA TCA GCA CGA CA 3' 5' ACG AAG ACG GCA GGA AAT A 3' | 297 |
| RyR2 | 5' TTT ACC AGC ACC CTA ATC TC 3' 5' CAG CCA AAT AAC GAA CTA CC 3' | 348 |
| RyR3 | 5' TCT GCT GTC TGG GTC TAT CTC 3' 5' CCA AAT GTC TTA TGC GTC AC 3' | 262 |
| SERCA1 | 5' GTG ATC CGC CAG CTA ATG 3' 5' CGA ATG TCA GGT CCG TCT 3' | 361 |
| SERCA2 | 5' CGC TAC CTC ATC TCG TCC A 3' 5' TCG GGT ATG GGG ATT CAA 3' | 406 |
| SERCA3 | 5' GAT GGA GTG AAC GAC GCA 3' 5' CCA GGT ATC GGA AGA AGA G 3' | 409 |
| VDAC1 | 5' CAC CAC GTA TGC CGA TCT TG 3' 5' TGC TTG AAA TTC CAG TCC 3' | 340 |
| VDAC2 | 5' CAC CTC ATA TGC TGA CCT TGG C 3' 5' AGC CTC CAA CTC CAG GGC 3' | 340 |
| VDAC3 | 5' CAC CAC ACC AAC GTA CTG TG 3' 5' AGC TTC CAG TTC AAA TCC 3' | 340 |
| hOGG1 | 5' TGG AAG AAC AGG GCG GGC TA 3' 5' ATG GAC ATC CAC GGG CAC AG 3' | 164 |
| HPRT1 | 5' GAC CAG TCA ACA GGG GAC ATA A 3' 5' AAG CTT GCG ACC TTG ACC 3' | 149 |

Table 2.3
Antibodies information

| Names | Companies | Dilution |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|
| TRPV5 | Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA | 1/1000 |
| TRPV6 | Alomone labs, Jerusalem, Israel | 1/1000 |
| CaBP-9k | Santa Cruz, Santa Cruz, Ca, USA | 1/1000 |
| CaBP-28k | Sigma, Oakville, ON, Canada | 1/1000 |
| PMCA1/4 | Santa Cruz, Santa Cruz, Ca, USA | 1/1000 |
| GAPDH | Chemicon International, Temecula, CA, USA | 1/5000 |
| anti-mouse-IgG HRP-conjugated | Chemicon International | 1/3000 |
| Anti-rabbit-IgG HRP conjugated | Cell Signaling Danvers, MA, USA | 1/2500 |
| cytokeratin-7 FITC-conjugated | Abcam | 1.25 µg per 10 ⁶ cells |

2.2.9 FIGURE LEGENDS

Figure 2.1 *The calcium transport decreases in trophoblasts issued PE placentas.*

- a) This calcium transport analysis was performed after 4 days of culture with radioactive calcium ($^{45}\text{CaCl}_2$) and was performed for different time intervals. The Ca^{2+} transport is expressed as nano mole of Ca^{2+} (from specific activity) per milligram of cellular proteins. The results are the mean \pm SEM of experiment performed in duplicates on cell preparations from 5 normal and 4 PE placentas.
- b) The viability of trophoblasts from day 1 to day 4 of culture is not significantly decreasing in PE cultured cells compared to normal. The viability was measured by the MTT assay and the results are shown as optic density measured at 570nm of the blue formazan crystals formed.

Figure 2.2 *Protein and mRNA expression of calcium channels TRPV5 and TRPV6 in placentas coming from normal women compared to women with PE.* (a) The protein expression of TRPV5 is significantly decreased in placentas PE compared to normal ones ($p = 0.0098$). (b) TRPV5 mRNA expression is decreased in PE compared to normal placentas ($p = 0.0044$). (c) The protein expression of TRPV6 is significantly decreased in placentas with PE compared to normal ones ($p = 0.0092$). (d) The mRNA expression of TRPV6 is significantly decreased in PE compared to normal placentas ($p = 0.0156$). The number of placentas tested for the mRNA expression is shown in parentheses for (b) and (d). For protein and mRNA expression, data were normalized according to amido black total protein levels and to HPRT1 housekeeping gene, respectively. * $P < 0.05$.

Figure 2.3 Protein and mRNA expression of CaBP-9K and -28K in placentas coming from healthy women compared to women with PE. (a) The placental protein expression of CaBP-9K is significantly decreased in PE placentas compared to normal ones ($p = 0.0268$). (b) CaBP-9K mRNA expression is significantly lower in PE compared to normal placentas ($p = 0.0465$). (c) The protein expression of the CaBP-28K gene is decreased in placentas with PE ($p = 0.0055$). (d) The mRNA expression of CaBP-28K is significantly decreased in placentas with PE compared to normal placentas ($p = 0.0383$). The number of placentas tested for the mRNA expression is shown in parentheses for (b) and (d). For protein and mRNA expression, data were normalized according to amido black total protein levels and to HPRT1 housekeeping gene, respectively. * $P < 0.05$.

Figure 2.4 Protein and mRNA expression of calcium pumps (PMCA) isoforms 1 and 4 in normal and PE placentas. (a) This graph shows that the protein expression of both PMCA1 and 4 is significantly decreased in placentas PE compared to normal placentas ($p = 0.0256$). (b) The mRNA expression of PMCA1 is significantly decreased in PE placentas compared to normal group (0.0007). (c) The mRNA expression of PMCA 4 is significantly decreased in PE compared to normal placentas ($p = 0.0082$). The number of placentas tested for the mRNA expression is shown in parentheses for (b) and (c). For protein and mRNA expression, data were normalized according to amido black total protein levels and to HPRT1 housekeeping gene, respectively. * $P < 0.05$.

Figure 2.5 mRNA expression of the ATP synthase gene in normal and PE placentas. The mRNA expression is significantly decreased in PE compared to normal placentas ($p = 0.0098$). The number of placentas tested for the mRNA expression is shown in parentheses. * $P < 0.05$.

Figure 2.6 mRNA expression of 3 isoforms of the IP3R gene in normal and PE placentas.

The mRNA expression is significantly decreased in PE compared to normal placentas for (a) IP3R1 ($p = 0.0287$) and (b) IP3R2 ($p = 0.0366$). (c) The mRNA expression of IP3R3 is not altered in PE placentas. The number of placentas tested is shown in parentheses. * $P < 0.05$.

Figure 2.7 mRNA expression of 3 isoforms of the RyR gene in normal and PE placentas.

The mRNA expression is significantly decreased in PE compared to normal placentas for (a) RyR1 ($p = 0.0336$), (b) RyR2 ($p = 0.0320$) and (c) RyR3 ($p = 0.0179$). The number of placentas tested is shown in parentheses. * $P < 0.05$.

Figure 2.8 mRNA expression of 3 isoforms of the SERCA gene in normal and PE placentas.

The mRNA expression is significantly increased in PE compared to normal placentas for (a) SERCA1 ($p = 0.0147$), (b) SERCA2 ($p = 0.0225$) and (c) SERCA3 ($p = 0.0092$). The number of placentas tested is shown in parentheses. * $P < 0.05$.

Figure 2.9 mRNA expression of 3 isoforms of the VDAC gene in normal and PE placentas.

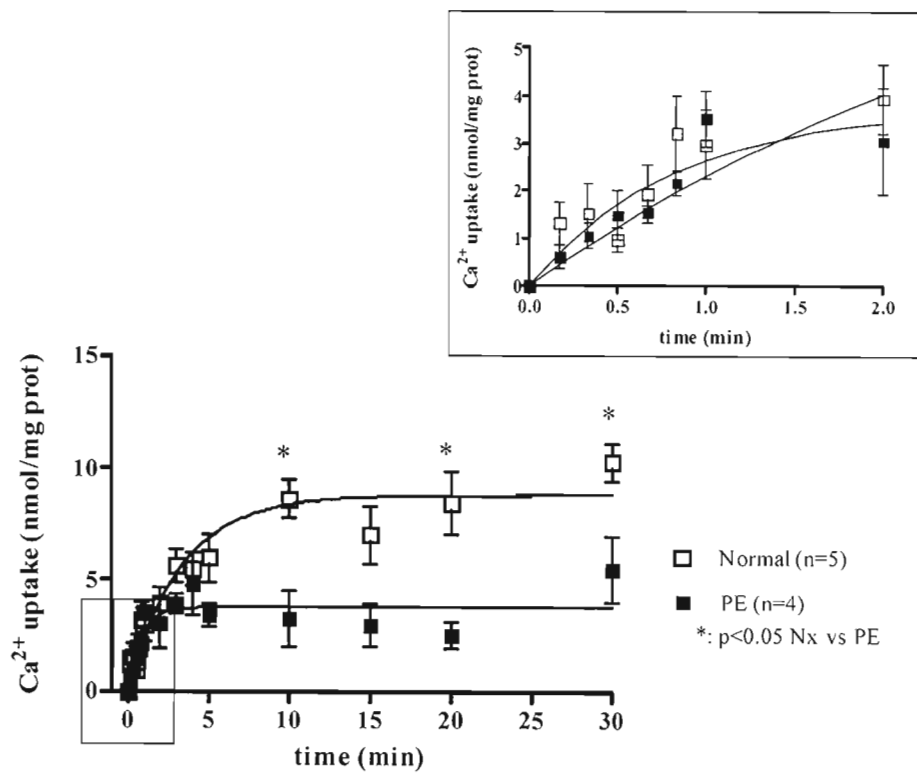
The mRNA expression of (a) VDAC1 et (b) VDAC2 is not altered in PE placentas, while it is significantly increased for (c) the VDAC3 isoforms compared to normal ones ($p = 0.0253$). The number of placentas tested is shown in parentheses. * $P < 0.05$.

Figure 2.10 mRNA expression of the hOGG1 gene in normal and PE placentas.

The mRNA expression is significantly increased in PE compared to normal placentas ($p = 0.0126$). The number of placentas tested for the mRNA expression is shown in parentheses. * $P < 0.05$

2.2.10 FIGURES

A)



B)

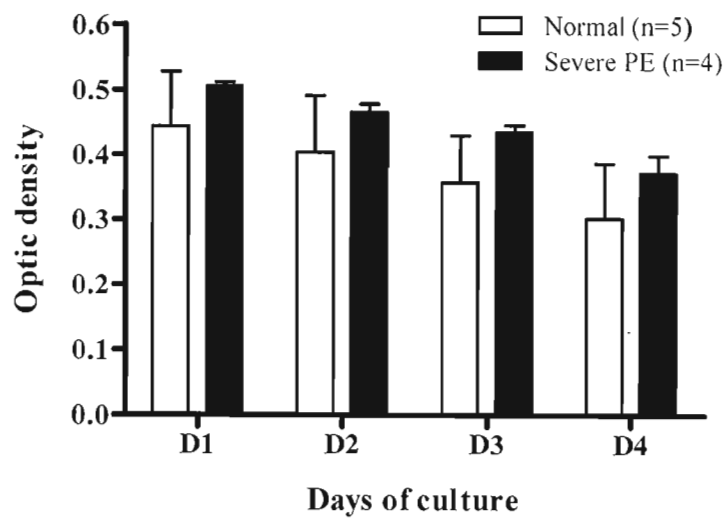


Figure 2.1

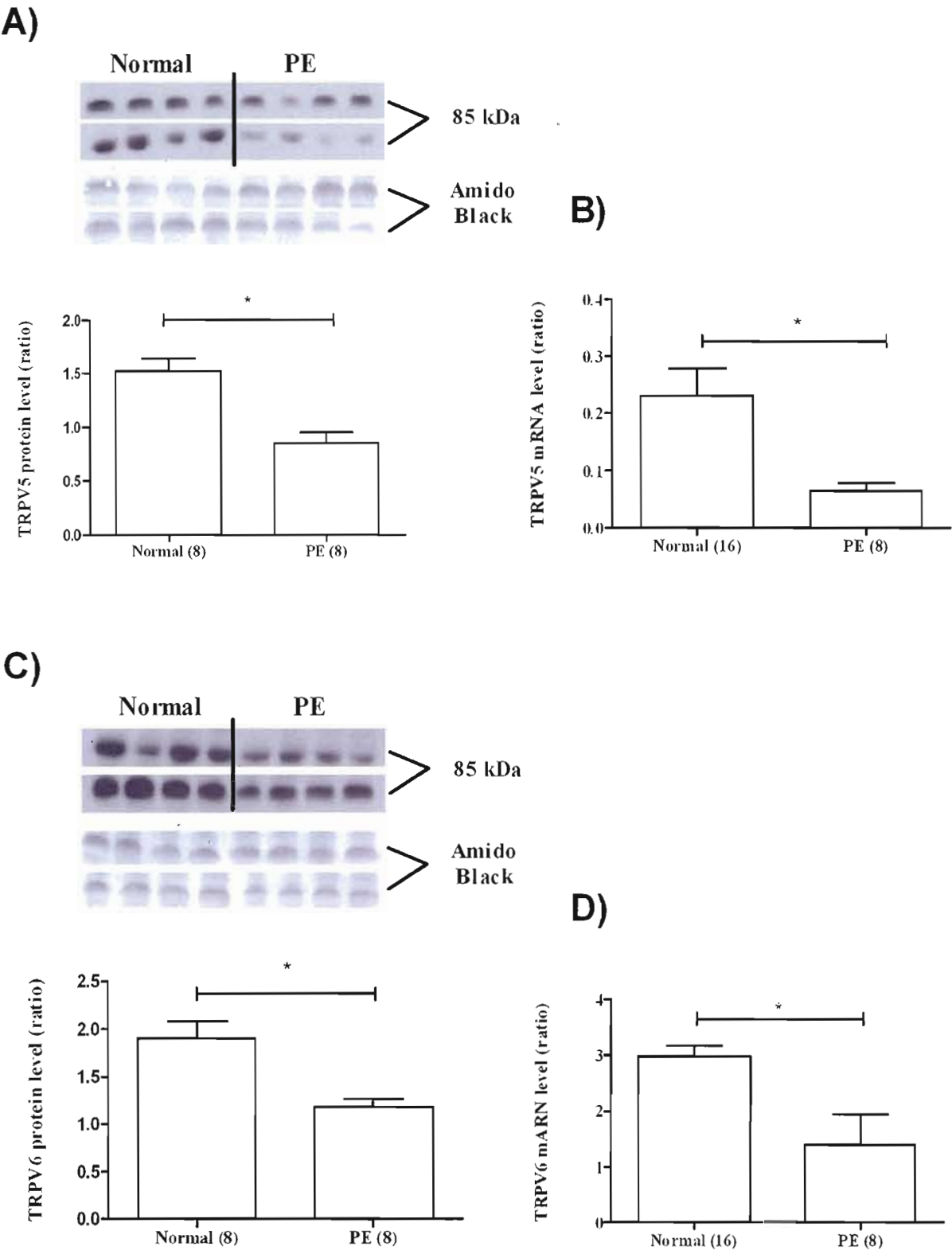


Figure 2.2

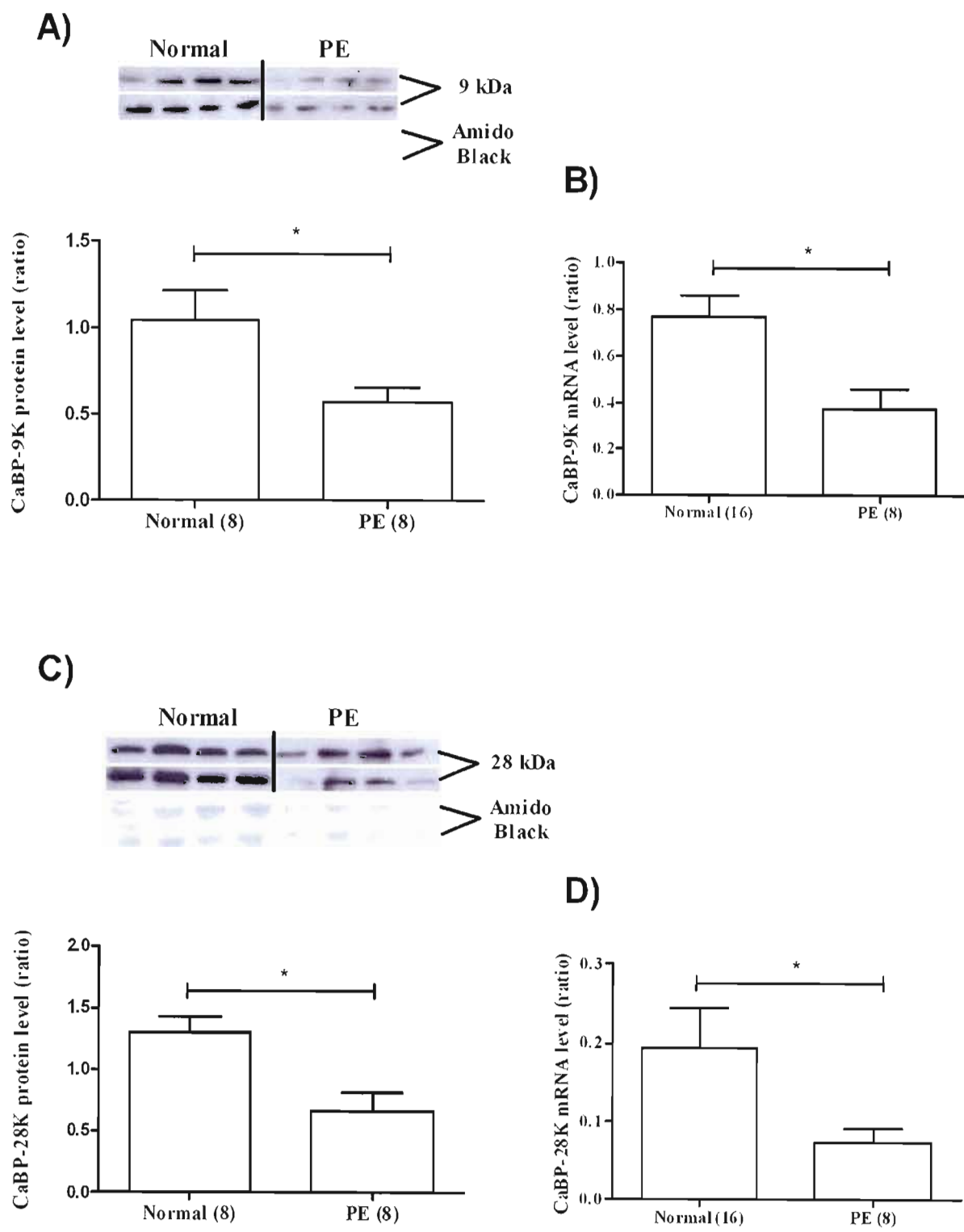


Figure 2.3

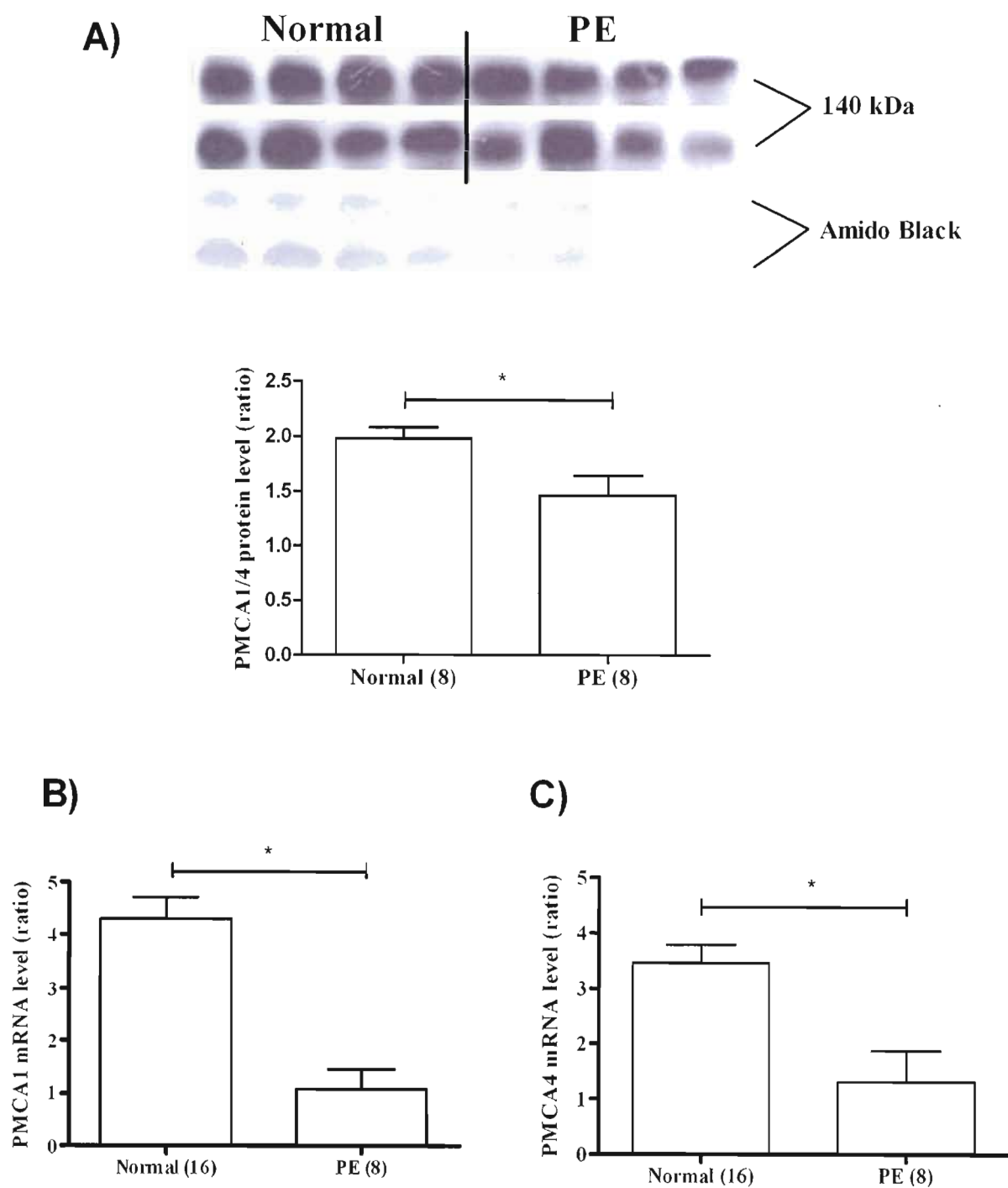
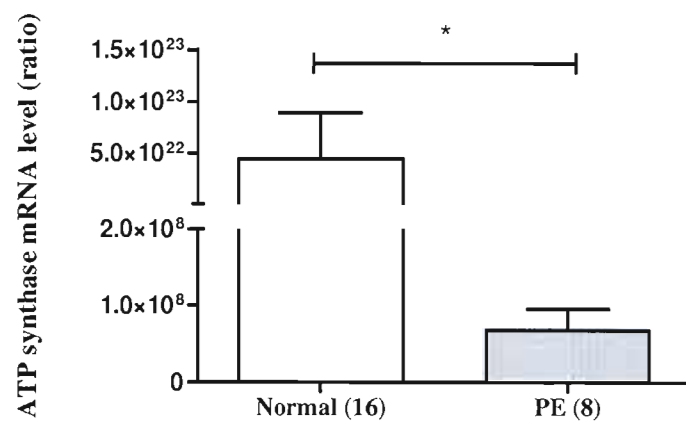


Figure 2.4

**Figure 2.5**

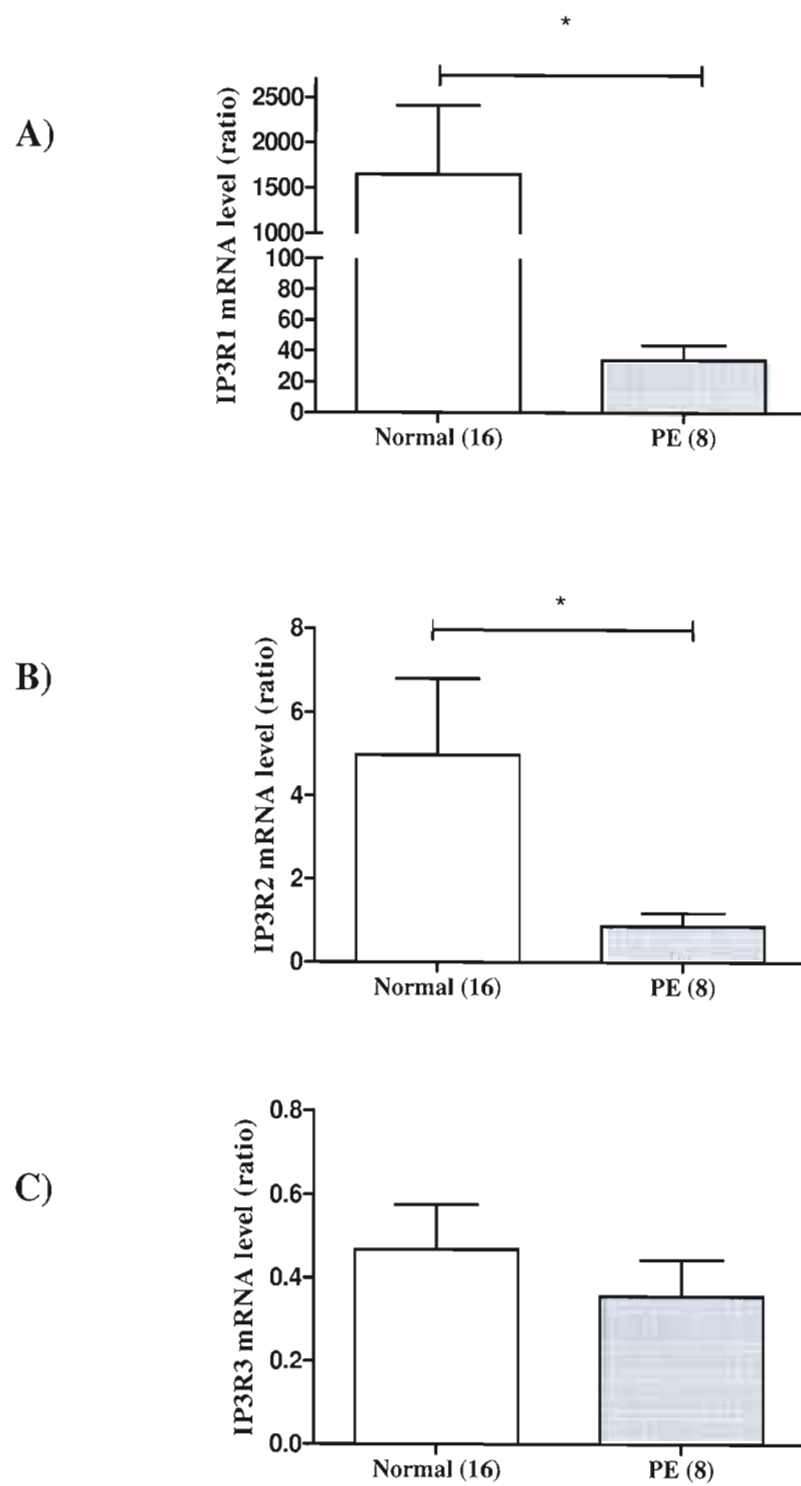


Figure 2.6

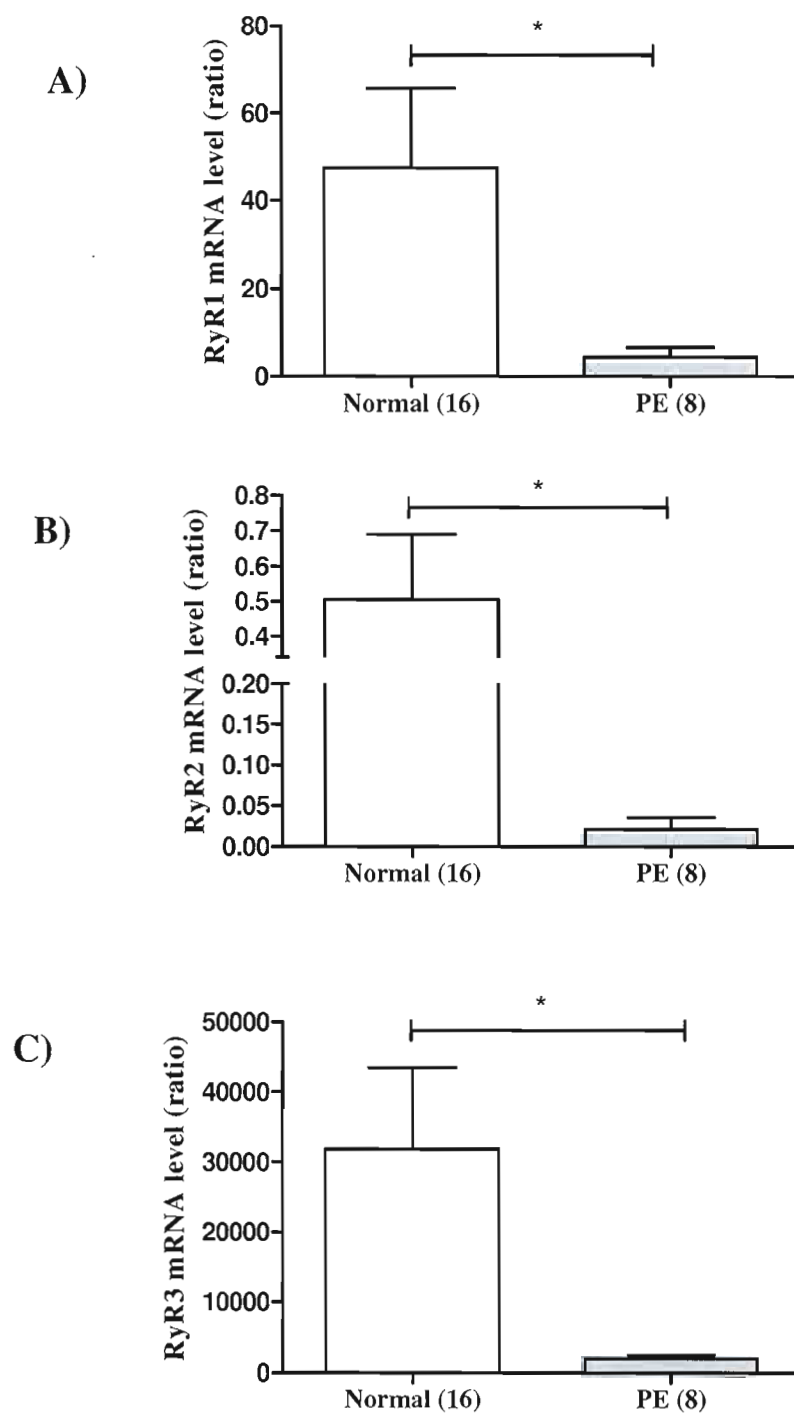


Figure 2.7

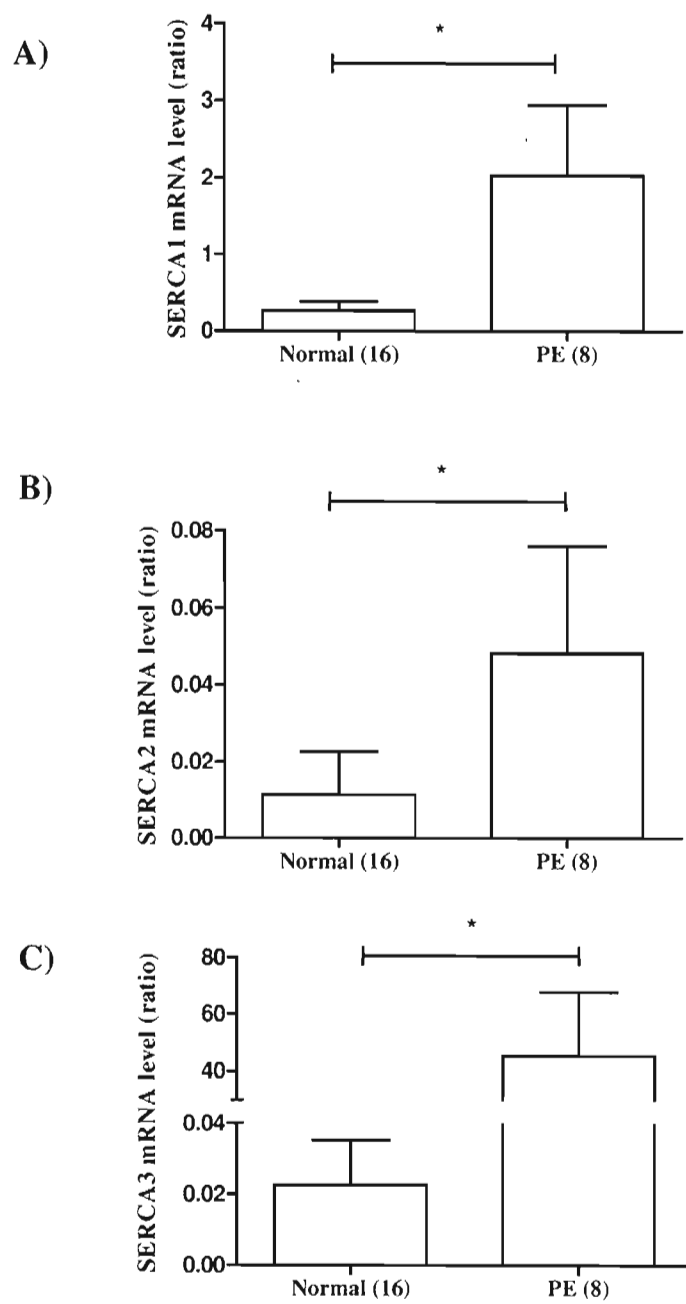


Figure 2.8

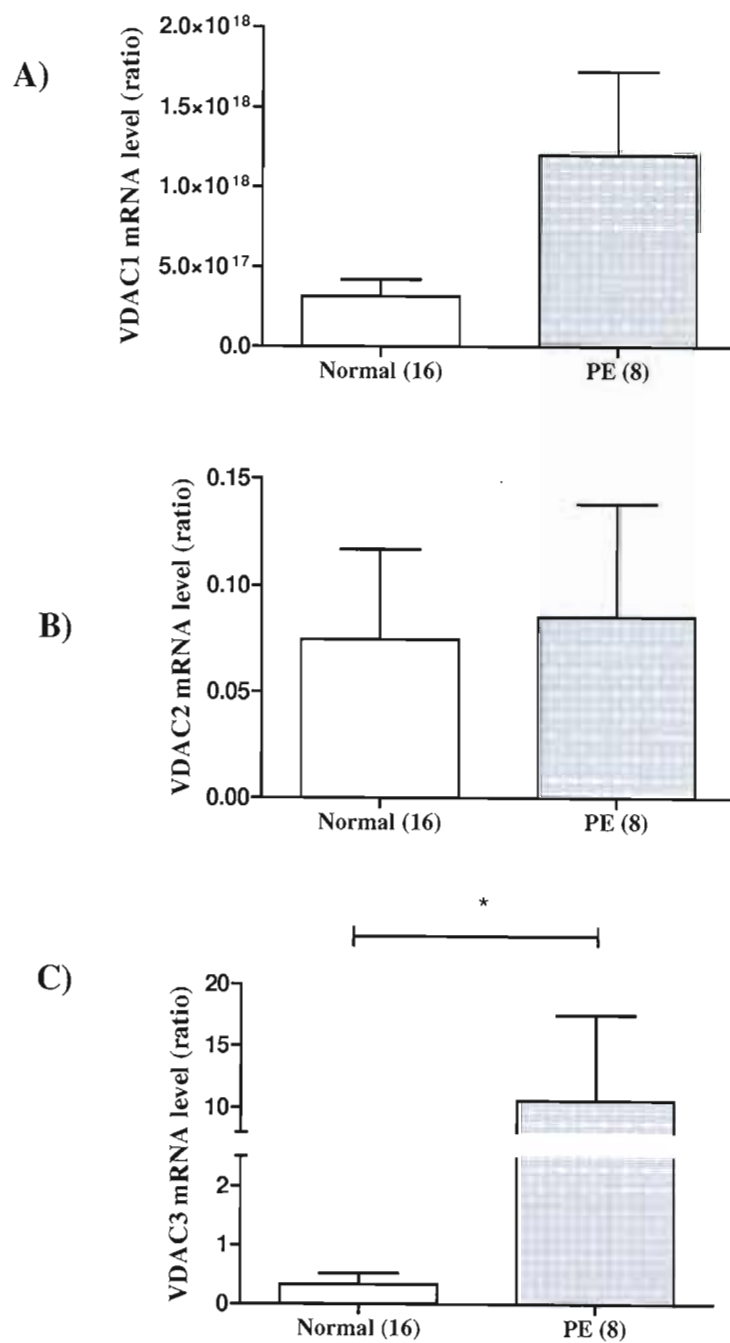
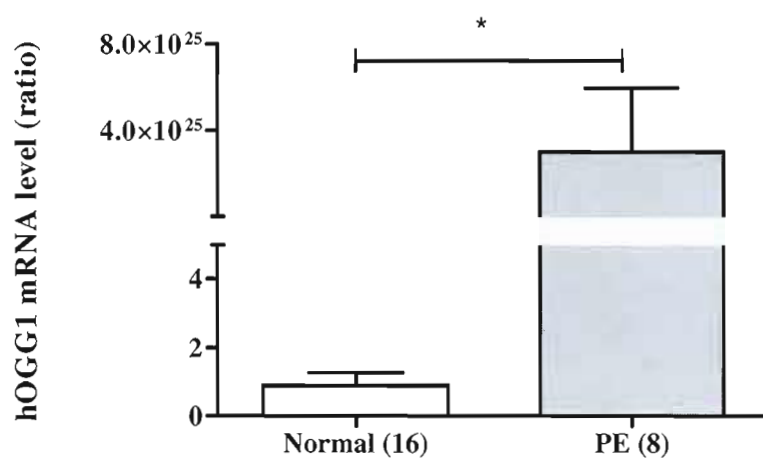


Figure 2.9

**Figure 2.10**

CHAPITRE III

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

La PE est une maladie concernant exclusivement les femmes enceintes et menaçant à la fois la mère et son fœtus. Affectant au moins 7-10% de toutes les grossesses, la PE progresse rapidement et se caractérise généralement par une pression artérielle élevée et la présence de protéines dans l'urine. L'apparition d'œdème, une prise de poids soudaine, des maux de tête et des troubles dans la vision sont des symptômes majeurs, mais certaines femmes atteintes de la PE rapportent peu de ces symptômes. Bien que la pathogénèse de la PE reste encore mal comprise, plusieurs études démontrent un lien avec l'homéostasie du Ca^{2+} (Duley *et al.*, 2007; Lopez-Jaramillo, Casas et Serrano, 2001).

Il est bien connu que le calcium est un minéral fondamental pour notre corps et est le plus abondant dans notre organisme. Il est essentiel pour le développement, le maintien et la solidité des os, pour la régulation de la pression sanguine, le bon fonctionnement du système nerveux et nécessaire à la contraction et la relaxation musculaire (Belkacemi *et al.*, 2005). La vitamine D est nécessaire pour une bonne absorption de Ca^{2+} . Effectivement, dans notre corps, la vitamine D se transforme en sa forme active hormonale, laquelle induit la synthèse de protéines responsables de l'absorption de Ca^{2+} (Nijenhuis T., 2005). Des dérèglements dans l'homéostasie du Ca^{2+} , menant à une hyper- ou hypocalcémie, peuvent avoir des conséquences graves sur la santé. De plus, une trop grande concentration de Ca^{2+} intracellulaire est létale pour la cellule (Belkacemi *et al.*, 2005).

L'importance d'un apport adéquat de Ca^{2+} alimentaire pendant la grossesse est soutenue par de nombreuses études (Adamova, Ozkan et Khalil, 2009; Bergel et Barros, 2007; Richie L.D., 2000). Des changements associés à la grossesse dans le métabolisme du Ca^{2+} et de la concentration de Ca^{2+} plasmatique ont été observés, notons les changements dans la

concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre décrits dans les globules rouges, les plaquettes et les cellules immunitaires. En outre, pendant la grossesse, une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules endothéliales stimule la production de substances vasodilatatrices telles que l'oxyde nitrique et la prostacycline (Adamova, Ozkan et Khalil, 2009). De plus, il a récemment été démontré qu'une supplémentation en Ca^{2+} semblait réduire de moitié le risque de PE, le risque de naissance prématurée et de morbidité sérieuse ou de mortalité maternelle et/ou fœtale (Hofmeyr *et al.*).

Lors du projet présenté ici (Hache *et al.*), nous avons su démontrer qu'effectivement, l'homéostasie calcique était perturbée dans les placentas PE. Plus précisément, que l'expression d'ARNm ainsi que l'expression protéique des canaux Ca^{2+} d'entrée TRPV5 et TRPV6, des protéines de liaison au Ca^{2+} CaBP-9K et CaBP-28K et les pompes calciques PMCA1 et PMCA4 étaient diminuées dans les placentas PE. En ce qui a trait à la signalisation intracellulaire du Ca^{2+} , nous avons observé une baisse significative de l'expression en ARNm de certains gènes importants pour la libération de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire, notons les gènes IP3R1, IP3R2, RyR1, RyR2 et RyR3, ainsi qu'une augmentation de l'expression en ARNm de certains gènes importants pour l'emmagasinement de Ca^{2+} comme les gènes SERCA1, SERCA2, SERCA3 et VDAC3. De plus, nous avons observé certains mécanismes qui pourraient être responsables de ce phénomène, comme la présence d'un SO trop élevé et d'un manque d'ATP. Une étude récente a démontré qu'une inhibition des PMCA avait des répercussions semblables à celles observées lors de PE, contrairement à une inhibition des SERCA, n'ayant aucun effet sur le taux de résistance des artères ni sur la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Wimalasundera *et al.*). Ces observations suggèrent qu'une diminution de l'activité des PMCA pourrait être un mécanisme contribuant à la résistance périphérique élevée des artères, donc à l'hypertension, dans la PE.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude sont très intéressants et nous ont poussé à aller observer, de façon préliminaire, si l'expression de certains régulateurs hormonaux du Ca^{2+} était aussi altérée. Nous avons alors observé une diminution significative de l'expression d'ARNm du récepteur de la progestérone (PGR), des récepteurs d'œstrogènes (ERa et ERb), du récepteur de la vitamine D (VDR), du gène mitochondrial du cytochrome P450 25-

hydroxyvitamine D-1 α -hydroxylase (1 α -hydroxylase), du gène de la 25-hydroxyvitamin D₃ 24hydroxylase (24OHase), lesquels représentent des enzymes importants dans la régulation de la forme active de la vitamine D (1,25(OH)₂D₃) (Diaz *et al.*, 2000) ainsi que des récepteurs de la PTHrP (PTHR1 et PTHR2) (voir figures dans l'appendice A). Ces résultats préliminaires suggèrent que la progestérone, les œstrogènes, la vitamine D ainsi que la PTHrP auraient un rôle dans la régulation du transfert de Ca²⁺ transplacentaire, et que cette régulation hormonale du Ca²⁺ serait altérée en présence de PE.

Ainsi, il est possible d'envisager la nécessité éventuelle d'une intervention diététique à l'aide de suppléments de Ca²⁺ et/ou de vitamine D et/ou de PTHrP dans les grossesses PE afin d'améliorer le métabolisme osseux et la santé de l'enfant à naître. De plus, une étude a observé que l'isoflavone génistéine, faisant partie du groupe des phytoestrogènes naturelles, inhibait deux mécanismes qui pourraient faire augmenter la concentration de Ca²⁺ intracellulaire dans les cellules musculaires lisses des artères ombilicales et pourrait se comporter comme une substance potentiellement vasorelaxante des vaisseaux du fœtus. Tenant compte du fait que la génistéine est capable de traverser la barrière placentaire, ces données montrent que les isoflavones pourraient avoir des implications importantes dans la régulation de la circulation sanguine foeto-maternelle chez les femmes enceintes qui consomment des produits dérivés du soja dans le cadre de leurs repas (Speroni *et al.*, 2009).

On connaît mal les conséquences post-natales à long terme du transfert de Ca²⁺ transplacentaire insuffisant. Récemment, les données de larges essais randomisés ont démontré que la supplémentation en Ca²⁺ pendant la grossesse a été associée à une diminution de la pression artérielle systolique chez les enfants issus de grossesses avec hypertension (Belizan *et al.*, 1997; Hatton *et al.*, 2003), suggérant la contribution de l'apport du Ca²⁺ fœtal à la programmation de la pression sanguine fœtale. Une autre étude a signalé que le poids de naissance est corrélé positivement avec la masse osseuse et le contenu minéral osseux à l'âge adulte (Antoniades *et al.*, 2003). Les auteurs suggèrent que les facteurs placentaires jouent un rôle clé dans la programmation fœtale du développement du squelette. De plus, une étude récente suggère que, comme le dérèglement de la voie de signalisation du Ca²⁺ dans les cellules endothéliales ombilicales est maintenu en culture et que le développement de l'embryon, du fœtus et le développement postnatal est affecté par l'état d'oxydation cellulaire,

les altérations de la voie de signalisation redox dans les grossesses PE pourraient influencer la programmation du système cardio-vasculaire du fœtus et de la fonction endothéliale chez l'adulte (Steinert *et al.*, 2009). En perspective, il serait très intéressant d'approfondir la question à savoir si les échanges de Ca^{2+} transplacentaire pourraient être un des mécanismes responsables pour la programmation des troubles de développement post-nataux dans les grossesses PE et RCIU.

Cette étude n'aura pas un impact immédiat dans la pratique clinique, mais il a permis une première étape de la caractérisation du processus de transfert de Ca^{2+} de la mère au fœtus dans les grossesses PE et ouvre les portes sur des études futures afin d'évaluer si, finalement, il sera possible d'améliorer le transfert placentaire par l'intervention nutritionnelle, pharmacologique et/ou hormonale.

CHAPITRE IV

BIBLIOGRAPHIE

- ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. (2002) *Int J Gynaecol Obstet* 77 67-75 2002/07/04
- Adamova, Z., Ozkan, S. et Khalil, R. A. (2009). "Vascular and cellular calcium in normal and hypertensive pregnancy." *Curr Clin Pharmacol* 4(3): 172-90.
- Altman, D., Carroli, G., Duley, L., Farrell, B., Moodley, J., Neilson, J. et Smith, D. (2002). "Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial." *Lancet* 359(9321): 1877-90.
- Antoniades, L., MacGregor, A. J., Andrew, T. et Spector, T. D. (2003). "Association of birth weight with osteoporosis and osteoarthritis in adult twins." *Rheumatology (Oxford)* 42(6): 791-6.
- Atallah, A. N., Hofmeyr, G. J. et Duley, L. (2002). "Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems." *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD001059.
- Athukorala, C., Rumbold, A. R., Willson, K. J. et Crowther, C. A. "The risk of adverse pregnancy outcomes in women who are overweight or obese." *BMC Pregnancy Childbirth* 10: 56.
- Barden, A., Singh, R., Walters, B. N., Ritchie, J., Roberman, B. et Beilin, L. J. (2004). "Factors predisposing to pre-eclampsia in women with gestational diabetes." *J Hypertens* 22(12): 2371-8.
- Belizan, J. M., Villar, J., Bergel, E., del Pino, A., Di Fulvio, S., Galliano, S. V. et Kattan, C. (1997). "Long-term effect of calcium supplementation during pregnancy on the blood pressure of offspring: follow up of a randomised controlled trial." *BMJ* 315(7103): 281-5.
- Belizan, J. M., Villar, J. et Repke, J. (1988). "The relationship between calcium intake and pregnancy-induced hypertension: up-to-date evidence." *Am J Obstet Gynecol* 158(4): 898-902.
- Belkacemi, L., Bedard, I., Simoneau, L. et Lafond, J. (2005). "Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review." *Cell Calcium* 37(1): 1-8.
- Benirschke, K., kaufmann, P. (2000). *Pathology of human placenta*. New York, Springer-Verlag.
- Bergel, E. et Barros, A. J. (2007). "Effect of maternal calcium intake during pregnancy on children's blood pressure: a systematic review of the literature." *BMC Pediatr* 7: 15.

- Bernucci, L., Henriquez, M., Diaz, P. et Riquelme, G. (2006). "Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane." *Placenta* **27**(11-12): 1082-95.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. et Roderick, H. L. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 517-29.
- Berridge, M. J., Lipp, P. et Bootman, M. D. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 11-21.
- Bertrand, C. et St-Louis, J. (1999). "Reactivities to serotonin and histamine in umbilical and placental vessels during the third trimester after normotensive pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* **180**(3 Pt 1): 650-9.
- Bezprozvanny, I. (2005). "The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." *Cell Calcium* **38**(3-4): 261-72.
- Billiar, R. B., Pepe, G. J. et Albrecht, E. D. (1997). "Immunocytochemical identification of the oestrogen receptor in the nuclei of cultured human placental syncytiotrophoblasts." *Placenta* **18**(4): 365-70.
- Blazy, I., Guillot, F., Laborde, K. et Dechaux, M. (1989). "Comparison of plasma renin and prorenin in healthy infants and children as determined with an enzymatic method and a new direct immunoradiometric assay." *Scand J Clin Lab Invest* **49**(5): 413-8.
- Bodnar, L. M., Catov, J. M., Simhan, H. N., Holick, M. F., Powers, R. W. et Roberts, J. M. (2007). "Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(9): 3517-22.
- Bodnar, L. M., Ness, R. B., Harger, G. F. et Roberts, J. M. (2005). "Inflammation and triglycerides partially mediate the effect of prepregnancy body mass index on the risk of preeclampsia." *Am J Epidemiol* **162**(12): 1198-206.
- Bodnar, L. M., Ness, R. B., Markovic, N. et Roberts, J. M. (2005). "The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index." *Ann Epidemiol* **15**(7): 475-82.
- Bootman, M. D. et Berridge, M. J. (1995). "The elemental principles of calcium signaling." *Cell* **83**(5): 675-8.
- Brosens, I., Robertson, W. B. et Dixon, H. G. (1967). "The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy." *J Pathol Bacteriol* **93**(2): 569-79.
- Campbell, D. M., MacGillivray, I. et Carr-Hill, R. (1985). "Pre-eclampsia in second pregnancy." *Br J Obstet Gynaecol* **92**(2): 131-40.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D. et Brini, M. (2001). "Generation, control, and processing of cellular calcium signals." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**(2): 107-260.
- Carrera, F., Casart, Y. C., Proverbio, T., Proverbio, F. et Marin, R. (2003). "Preeclampsia and calcium-ATPase activity of plasma membranes from human myometrium and placental trophoblast." *Hypertens Pregnancy* **22**(3): 295-304.
- Carter, A. M. (2007). "Animal models of human placentation--a review." *Placenta* **28 Suppl A**: S41-7.
- Chaouat, G., Ledee-Bataille, N. et Dubanchet, S. (2005). "Immunological similarities between implantation and pre-eclampsia." *Am J Reprod Immunol* **53**(5): 222-9.
- Chappell, L. C., Seed, P. T., Briley, A. L., Kelly, F. J., Lee, R., Hunt, B. J., Parmar, K., Bewley, S. J., Shennan, A. H., Steer, P. J. et Poston, L. (1999). "Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial." *Lancet* **354**(9181): 810-6.

- Chen, X. K., Wen, S. W., Bottomley, J., Smith, G. N., Leader, A. et Walker, M. C. (2009). "In vitro fertilization is associated with an increased risk for preeclampsia." Hypertens Pregnancy **28**(1): 1-12.
- Chen, Y. Y., Wu, M. L., Kao, M. H., Su, T. H. et Chen, C. P. (2009). "Perinatal outcome of recurrent pre-eclampsia versus pre-eclampsia in nulliparas." J Obstet Gynaecol Res **35**(6): 1042-6.
- Cheng, M. H. et Wang, P. H. (2009). "Placentation abnormalities in the pathophysiology of preeclampsia." Expert Rev Mol Diagn **9**(1): 37-49.
- Chesley, L. C. (1980). "Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis." Kidney Int **18**(2): 234-40.
- Chesley, L. C. (1985). "Diagnosis of preeclampsia." Obstet Gynecol **65**(3): 423-5.
- Choi, K. C., Leung, P. C. et Jeung, E. B. (2005). "Biology and physiology of Calbindin-D9k in female reproductive tissues: involvement of steroids and endocrine disruptors." Reprod Biol Endocrinol **3**: 66.
- Cindrova-Davies, T. (2009). "Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction." Placenta **30**: S55-65.
- Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell **131**(6): 1047-58.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W. et Strubing, C. (2001). "The TRP ion channel family." Nat Rev Neurosci **2**(6): 387-96.
- Clifton, V. L., Gu, Q., Murphy, V. E., Schwartz, J., Madsen, G. et Smith, R. (2000). "Localization and characterization of urocortin during human pregnancy." Placenta **21**(8): 782-8.
- Clifton, V. L., Read, M. A., Leitch, I. M., Giles, W. B., Boura, A. L., Robinson, P. J. et Smith, R. (1995). "Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal-placental circulation: involvement of the nitric oxide-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway." J Clin Endocrinol Metab **80**(10): 2888-93.
- Cross, J. C., Werb, Z. et Fisher, S. J. (1994). "Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle." Science **266**(5190): 1508-18.
- Curtis, N. E., Thomas, R. J., Gillespie, M. T., King, R. G., Rice, G. E. et Wloddek, M. E. (1998). "Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) mRNA splicing and parathyroid hormone/PTHrP receptor mRNA expression in human placenta and fetal membranes." J Mol Endocrinol **21**(2): 225-34.
- Darwish, H. M. et DeLuca, H. F. (1992). "Identification of a 1,25-dihydroxyvitamin D3-response element in the 5'-flanking region of the rat calbindin D-9k gene." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 603-7.
- de Groot, C. J., O'Brien, T. J. et Taylor, R. N. (1996). "Biochemical evidence of impaired trophoblastic invasion of decidual stroma in women destined to have preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **175**(1): 24-9.
- Dekker, G. (2002). "The partner's role in the etiology of preeclampsia." J Reprod Immunol **57**(1-2): 203-15.
- Dekker, G. et Sibai, B. (2001). "Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia." Lancet **357**(9251): 209-15.
- Diaz, L., Sanchez, I., Avila, E., Halhali, A., Vilchis, F. et Larrea, F. (2000). "Identification of a 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2543-9.

- Duley, L., Henderson-Smart, D. J., Meher, S. et King, J. F. (2007). "Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications." Cochrane Database Syst Rev(2): CD004659.
- Dulhunty, A. F., Beard, N. A., Pouliquin, P. et Kimura, T. (2006). "Novel regulators of RyR Ca²⁺ release channels: insight into molecular changes in genetically-linked myopathies." J Muscle Res Cell Motil **27**(5-7): 351-65.
- East, J. M. (2000). "Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure/function and biology (review)." Mol Membr Biol **17**(4): 189-200.
- Easterling, T. R. (1992). "The maternal hemodynamics of preeclampsia." Clin Obstet Gynecol **35**(2): 375-86.
- Esplin, M. S., Fausett, M. B., Fraser, A., Kerber, R., Mineau, G., Carrillo, J. et Varner, M. W. (2001). "Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia." N Engl J Med **344**(12): 867-72.
- Evain-Brion, D. (2001). "[The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]." Gynecol Obstet Fertil **29**(7-8): 497-502.
- Foskett, J. K., White, C., Cheung, K. H. et Mak, D. O. (2007). "Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels." Physiol Rev **87**(2): 593-658.
- Garel, J. M. et Barlet, J. P. (1976). "Calcium metabolism in newborn animals: the interrelationship of calcium, magnesium, and inorganic phosphorus in newborn rats, foals, lambs, and calves." Pediatr Res **10**(8): 749-54.
- Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J. W. et Fisher, S. J. (1997). "Regulation of human placental development by oxygen tension." Science **277**(5332): 1669-72.
- Gillman, M. W., Hood, M. Y., Moore, L. L., Nguyen, U. S., Singer, M. R. et Andon, M. B. (1995). "Effect of calcium supplementation on blood pressure in children." J Pediatr **127**(2): 186-92.
- Glance, D. G., Elder, M. G., Bloxam, D. L. et Myatt, L. (1984). "The effects of the components of the renin-angiotensin system on the isolated perfused human placental cotyledon." Am J Obstet Gynecol **149**(4): 450-4.
- Glance, D. G., Elder, M. G. et Myatt, L. (1985). "Prostaglandin production and stimulation by angiotensin II in the isolated perfused human placental cotyledon." Am J Obstet Gynecol **151**(3): 387-91.
- Gratacos, E., Casals, E., Deulofeu, R., Cararach, V., Alonso, P. L. et Fortuny, A. (1998). "Lipid peroxide and vitamin E patterns in pregnant women with different types of hypertension in pregnancy." Am J Obstet Gynecol **178**(5): 1072-6.
- Gratacos, E., Casals, E., Deulofeu, R., Gomez, O., Cararach, V., Alonso, P. L. et Fortuny, A. (1999). "Serum and placental lipid peroxides in chronic hypertension during pregnancy with and without superimposed preeclampsia." Hypertens Pregnancy **18**(2): 139-46.
- Griffiths, E. J. et Rutter, G. A. (2009). "Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1787**(11): 1324-33.
- Grill, S., Rusterholz, C., Zanetti-Dallenbach, R., Tercanli, S., Holzgreve, W., Hahn, S. et Lapaire, O. (2009). "Potential markers of preeclampsia--a review." Reprod Biol Endocrinol **7**: 70.

- Hache, S., Takser, L., Lebellego, F., Weiler, H., Leduc, L., Forest, J. C., Giguere, Y., Masse, A., Barbeau, B. et Lafond, J. "Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta." J Cell Mol Med.
- Halhali, A., Diaz, L., Avila, E., Ariza, A. C., Garabedian, M. et Larrea, F. (2007). "Decreased fractional urinary calcium excretion and serum 1,25-dihydroxyvitamin D and IGF-I levels in preeclampsia." J Steroid Biochem Mol Biol **103**(3-5): 803-6.
- Hatton, D. C., Harrison-Hohner, J., Coste, S., Reller, M. et McCarron, D. (2003). "Gestational calcium supplementation and blood pressure in the offspring." Am J Hypertens **16**(10): 801-5.
- Heazell, A. E. et Crocker, I. P. (2008). "Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies." Placenta **29**(9): 772-83.
- Heizmann, C. W. et Hunziker, W. (1991). "Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights." Trends Biochem Sci **16**(3): 98-103.
- Hernandez-Diaz, S., Toh, S. et Cnattingius, S. (2009). "Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study." BMJ **338**: b2255.
- Hershberger, M. E. et Tuan, R. S. (1998). "Placental 57-kDa Ca(2+)-binding protein: regulation of expression and function in trophoblast calcium transport." Dev Biol **199**(1): 80-92.
- Hofmeyr, G. J., Duley, L. et Atallah, A. (2007). "Dietary calcium supplementation for prevention of pre-eclampsia and related problems: a systematic review and commentary." BJOG **114**(8): 933-43.
- Hofmeyr, G. J., Lawrie, T. A., Atallah, A. N. et Duley, L. "Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems." Cochrane Database Syst Rev **8**: CD001059.
- Holcberg, G., Kossenjans, W., Brewer, A., Miodovnik, M. et Myatt, L. (1995). "The action of two natriuretic peptides (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) in the human placental vasculature." Am J Obstet Gynecol **172**(1 Pt 1): 71-7.
- Holcberg, G., Kossenjans, W., Brewer, A., Miodovnik, M. et Myatt, L. (1995). "Selective vasodilator effects of atrial natriuretic peptide in the human placental vasculature." J Soc Gynecol Investig **2**(1): 1-5.
- Holcberg, G., Miodovnik, M., Rosenn, B., Kossenjans, W. et Myatt, L. (1995). "Interaction of angiotensin II and brain natriuretic peptide in the placentas of normal and diabetic women." Obstet Gynecol **85**(3): 428-32.
- Horton, A. L., Boggess, K. A., Moss, K. L., Beck, J. et Offenbacher, S. "Periodontal disease, oxidative stress, and risk for preeclampsia." J Periodontol **81**(2): 199-204.
- Hosking, D. J. (1996). "Calcium homeostasis in pregnancy." Clin Endocrinol (Oxf) **45**(1): 1-6.
- Howarth, C., Gazis, A. et James, D. (2007). "Associations of Type 1 diabetes mellitus, maternal vascular disease and complications of pregnancy." Diabet Med **24**(11): 1229-34.
- Hubel, C. A. (1999). "Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia." Proc Soc Exp Biol Med **222**(3): 222-35.
- Hughes, A. D. (1995). "Calcium channels in vascular smooth muscle cells." J Vasc Res **32**(6): 353-70.

- Hung, T. H. et Burton, G. J. (2006). "Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia." Taiwan J Obstet Gynecol **45**(3): 189-200.
- Huppertz, B. (2008). "Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis." Hypertension **51**(4): 970-5.
- Jahromi, B. N. et Hussein, Z. (2008). "Pregnancy outcome at maternal age 40 and older." Taiwan J Obstet Gynecol **47**(3): 318-21.
- Jerat, S., Morrish, D. W., Davidge, S. T. et Kaufman, S. (2001). "Effect of adrenomedullin on placental arteries in normal and preeclamptic pregnancies." Hypertension **37**(2): 227-31.
- Kahn, S. R., Platt, R., McNamara, H., Rozen, R., Chen, M. F., Genest, J., Jr., Goulet, L., Lydon, J., Seguin, L., Dassa, C., Masse, A., Asselin, G., Benjamin, A., Miner, L., Ghanem, A. et Kramer, M. S. (2009). "Inherited thrombophilia and preeclampsia within a multicenter cohort: the Montreal Preeclampsia Study." Am J Obstet Gynecol **200**(2): 151 e1-9; discussion e1-5.
- Karalis, K., Goodwin, G. et Majzoub, J. A. (1996). "Cortisol blockade of progesterone: a possible molecular mechanism involved in the initiation of human labor." Nat Med **2**(5): 556-60.
- Khan, F., Belch, J. J., MacLeod, M. et Mires, G. (2005). "Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops." Hypertension **46**(5): 1123-8.
- Kim, H. J., Lee, G. S., Ji, Y. K., Choi, K. C. et Jeung, E. B. (2006). "Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(2): E234-41.
- Kingdom, J. C. et Kaufmann, P. (1997). "Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia." Placenta **18**(8): 613-21; discussion 623-6.
- Kliman, H. J. (2000). "Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion." Am J Pathol **157**(6): 1759-68.
- Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M. et Strauss, J. F., 3rd (1986). "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae." Endocrinology **118**(4): 1567-82.
- Kovacs, C. S. (1995). "PTHrP gene knock out mouse have placental calcium transport severely impaired." J. Bone Miner **10**(73).
- Kovacs, C. S., Lanske, B., Hunzelman, J. L., Guo, J., Karaplis, A. C. et Kronenberg, H. M. (1996). "Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15233-8.
- Kujovich, J. L. (2004). "Thrombophilia and pregnancy complications." Am J Obstet Gynecol **191**(2): 412-24.
- Kupferminc, M. J. (2003). "Thrombophilia and pregnancy." Reprod Biol Endocrinol **1**: 111.
- Kwek, K., Read, M. A., Khong, T. Y., Bisits, A. T. et Walters, W. A. (2001). "Vasoactive effects of 8-epi-prostaglandin F(2 α) in isolated human placental conduit and resistance blood vessels in vitro." Placenta **22**(6): 526-33.
- Lafond, J. et Simoneau, L. (2006). "Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins." Int Rev Cytol **250**: 109-74.
- Le Bouteiller, P. et Tabiasco, J. (2006). "[Immunology of pregnancy: renewed interest]." Med Sci (Paris) **22**(8-9): 745-50.

- Lee, B. M., Lee, G. S., Jung, E. M., Choi, K. C. et Jeung, E. B. (2009). "Uterine and placental expression of TRPV6 gene is regulated via progesterone receptor- or estrogen receptor-mediated pathways during pregnancy in rodents." Reprod Biol Endocrinol **7**: 49.
- Lee, G. S. et Jeung, E. B. (2007). "Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(1): E132-8.
- Leiser, R. et Kaufmann, P. (1994). "Placental structure: in a comparative aspect." Exp Clin Endocrinol **102**(3): 122-34.
- Li, D. K. et Wi, S. (2000). "Changing paternity and the risk of preeclampsia/eclampsia in the subsequent pregnancy." Am J Epidemiol **151**(1): 57-62.
- Lie, R. T. (2007). "Intergenerational exchange and perinatal risks: a note on interpretation of generational recurrence risks." Paediatr Perinat Epidemiol **21 Suppl 1**: 13-8.
- Livingston, J. C., Haddad, B., Gorski, L. A., Neblett, P., Ahokas, R. A., Ramsey, R. et Sibai, B. M. (2001). "Placenta growth factor is not an early marker for the development of severe preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **184**(6): 1218-20.
- Livingston, J. C., Livingston, L. W., Ramsey, R., Mabie, B. C. et Sibai, B. M. (2003). "Magnesium sulfate in women with mild preeclampsia: a randomized controlled trial." Obstet Gynecol **101**(2): 217-20.
- Lopez-Jaramillo, P., Casas, J. P. et Serrano, N. (2001). "Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms." Braz J Med Biol Res **34**(10): 1227-35.
- Lunell, N. O., Nylund, L. E., Lewander, R. et Sarby, B. (1982). "Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia measurements with indium-113m and a computer-linked gamma camera." Clin Exp Hypertens B **1**(1): 105-17.
- Lyll, F. (2006). "Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia." Aust N Z J Obstet Gynaecol **46**(4): 266-73.
- Lyll, F., Barber, A., Myatt, L., Bulmer, J. N. et Robson, S. C. (2000). "Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function." FASEB J **14**(1): 208-19.
- Lyll, F., Gibson, J. L., Greer, I. A., Brockman, D. E., Eis, A. L. et Myatt, L. (1998). "Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress." Diabetes Care **21**(10): 1753-8.
- Lykke, J. A., Paidas, M. J. et Langhoff-Roos, J. (2009). "Recurring complications in second pregnancy." Obstet Gynecol **113**(6): 1217-24.
- MacKay, A. P., Berg, C. J. et Atrash, H. K. (2001). "Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia." Obstet Gynecol **97**(4): 533-8.
- Maioli, E., Fortino, V. et Pacini, A. (2004). "Parathyroid hormone-related protein in preeclampsia: a linkage between maternal and fetal failures." Biol Reprod **71**(6): 1779-84.
- Malassine, A. et Cronier, L. (2002). "Hormones and human trophoblast differentiation: a review." Endocrine **19**(1): 3-11.
- Mandsager, N. T., Brewer, A. S. et Myatt, L. (1994). "Vasodilator effects of parathyroid hormone, parathyroid hormone-related protein, and calcitonin gene-related peptide in the human fetal-placental circulation." J Soc Gynecol Investig **1**(1): 19-24.
- Many, A., Hubel, C. A., Fisher, S. J., Roberts, J. M. et Zhou, Y. (2000). "Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia." Am J Pathol **156**(1): 321-31.

- Marik, P. E. (2009). "Hypertensive disorders of pregnancy." *Postgrad Med* **121**(2): 69-76.
- McCormack, J. G., Halestrap, A. P. et Denton, R. M. (1990). "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism." *Physiol Rev* **70**(2): 391-425.
- McDonald, S. D., Best, C. et Lam, K. (2009). "The recurrence risk of severe de novo pre-eclampsia in singleton pregnancies: a population-based cohort." *BJOG* **116**(12): 1578-84.
- Merz, W. E. (1996). "Biosynthesis of human chorionic gonadotropin: a review." *Eur J Endocrinol* **135**(3): 269-84.
- Meziani, F., Van Overloop, B., Schneider, F. et Gairard, A. (2005). "Parathyroid hormone-related protein-induced relaxation of rat uterine arteries: influence of the endothelium during gestation." *J Soc Gynecol Investig* **12**(1): 14-9.
- Mikoshiba, K. (2007). "IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts." *J Neurochem* **102**(5): 1426-46.
- Moffett-King, A. (2002). "Natural killer cells and pregnancy." *Nat Rev Immunol* **2**(9): 656-63.
- Montell, C., Birnbaumer, L. et Flockerzi, V. (2002). "The TRP channels, a remarkably functional family." *Cell* **108**(5): 595-8.
- Moreau, R., Hamel, A., Daoud, G., Simoneau, L. et Lafond, J. (2002). "Expression of calcium channels along the differentiation of cultured trophoblast cells from human term placenta." *Biol Reprod* **67**(5): 1473-9.
- Mulligan, M. L., Felton, S. K., Riek, A. E. et Bernal-Mizrachi, C. (2009). "Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation." *Am J Obstet Gynecol*.
- Muneyvirici-Delale, O., Nacharaju, V. L., Altura, B. M. et Altura, B. T. (1998). "Sex steroid hormones modulate serum ionized magnesium and calcium levels throughout the menstrual cycle in women." *Fertil Steril* **69**(5): 958-62.
- Murphy, V. E., Smith, R., Giles, W. B. et Clifton, V. L. (2006). "Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus." *Endocr Rev* **27**(2): 141-69.
- Myatt, L. (1992). "Control of vascular resistance in the human placenta." *Placenta* **13**(4): 329-41.
- Myatt, L. (2002). "Role of placenta in preeclampsia." *Endocrine* **19**(1): 103-11.
- Myatt, L., Brewer, A. S. et Brockman, D. E. (1992). "The comparative effects of big endothelin-1, endothelin-1, and endothelin-3 in the human fetal-placental circulation." *Am J Obstet Gynecol* **167**(6): 1651-6.
- Myatt, L., Brockman, D. E., Eis, A. L. et Pollock, J. S. (1993). "Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta." *Placenta* **14**(5): 487-95.
- Myatt, L., Rosenfield, R. B., Eis, A. L., Brockman, D. E., Greer, I. et Lyall, F. (1996). "Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action." *Hypertension* **28**(3): 488-93.
- Najati, N. et Gojazadeh, M. "Maternal and neonatal complications in mothers aged under 18 years." *Patient Prefer Adherence* **4**: 219-22.
- Need, J. A. (1975). "Pre-eclampsia in pregnancies by different fathers: immunological studies." *Br Med J* **1**(5957): 548-9.
- Newhouse, S. M., Davidge, S. T., Winkler-Lowen, B., Demianczuk, N. et Guilbert, L. J. (2007). "In vitro differentiation of villous trophoblasts from pregnancies complicated

- by intrauterine growth restriction with and without pre-eclampsia." *Placenta* **28**(10): 999-1003.
- Nguyen, G., Garcia, R. T., Nguyen, N., Trinh, H., Keeffe, E. B. et Nguyen, M. H. (2009). "Clinical course of hepatitis B virus infection during pregnancy." *Aliment Pharmacol Ther* **29**(7): 755-64.
- Nielsen, A. H., Schauser, K. H. et Poulsen, K. (2000). "Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system." *Placenta* **21**(5-6): 468-77.
- Nijenhuis T., H. J. G. J., Bindels R.J.M (2005). "TRPV5 and TRPV6 in Ca^{2+} (re)absorption: regulating Ca^{2+} entry at the gate." *European Journal of Physiology* **451**: 181-192.
- Nikitenko, L., Morgan, G., Kolesnikov, S. I. et Wooding, F. B. (1998). "Immunocytochemical and In situ hybridization studies of the distribution of calbindin D9k in the bovine placenta throughout pregnancy." *J Histochem Cytochem* **46**(5): 679-88.
- Norris, L. A., Higgins, J. R., Darling, M. R., Walshe, J. J. et Bonnar, J. (1999). "Nitric oxide in the uteroplacental, fetoplacental, and peripheral circulations in preeclampsia." *Obstet Gynecol* **93**(6): 958-63.
- Ohara, N. (2001). "Calcium metabolism in pregnancy: disturbed calcium homeostasis in diabetic pregnancy and preeclampsia." *Clin Exp Obstet Gynecol* **28**(3): 133-41.
- Omigbodun, A., Ziolkiewicz, P., Tessler, C., Hoyer, J. R. et Coutifaris, C. (1997). "Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta?" *Endocrinology* **138**(10): 4308-15.
- Peng, J. B., Chen, X. Z., Berger, U. V., Weremowicz, S., Morton, C. C., Vassilev, P. M., Brown, E. M. et Hediger, M. A. (2000). "Human calcium transport protein CaT1." *Biochem Biophys Res Commun* **278**(2): 326-32.
- Periasamy, M., Bhupathy, P. et Babu, G. J. (2008). "Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology." *Cardiovasc Res* **77**(2): 265-73.
- Peticca, P., Keely, E. J., Walker, M. C., Yang, Q. et Bottomley, J. (2009). "Pregnancy outcomes in diabetes subtypes: how do they compare? A province-based study of Ontario, 2005-2006." *J Obstet Gynaecol Can* **31**(6): 487-96.
- Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C. et Genazzani, A. R. (1996). "Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms." *Endocr Rev* **17**(2): 156-86.
- Polyzos, N. P., Mauri, D., Tsappi, M., Tzioras, S., Kamposioras, K., Cortinovis, I. et Casazza, G. (2007). "Combined vitamin C and E supplementation during pregnancy for preeclampsia prevention: a systematic review." *Obstet Gynecol Surv* **62**(3): 202-6.
- Poston, L., Briley, A. L., Seed, P. T., Kelly, F. J. et Shennan, A. H. (2006). "Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial." *Lancet* **367**(9517): 1145-54.
- Pouliot, S. H., Xiong, X., Harville, E., Paz-Soldan, V., Tomashek, K. M., Breart, G. et Buekens, P. "Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review." *Obstet Gynecol Surv* **65**(2): 107-18.
- Redline, R. W. et Patterson, P. (1995). "Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast." *Hum Pathol* **26**(6): 594-600.
- Redman, C. W. (1991). "Current topic: pre-eclampsia and the placenta." *Placenta* **12**(4): 301-8.

- Redman, C. W. (2008). "The endoplasmic reticulum stress of placental impoverishment." Am J Pathol **173**(2): 311-4.
- Redman, C. W. et Sargent, I. L. (2009). "Placental stress and pre-eclampsia: a revised view." Placenta **30**: S38-42.
- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2000) Am J Obstet Gynecol **183** S1-S22 2000/08/02
- Richie L.D., e. K. J. C. (2000). "Dietary calcium and pregnancy-induced hypertension : Is there a relation?" The American Journal of Clinical nutrition **71**: 1371S-1374S.
- Roberts, J. M. (1998). "Endothelial dysfunction in preeclampsia." Semin Reprod Endocrinol **16**(1): 5-15.
- Roberts, J. M. et Gammill, H. S. (2005). "Preeclampsia: recent insights." Hypertension **46**(6): 1243-9.
- Roberts, J. M. et Hubel, C. A. (2009). "The two stage model of preeclampsia: variations on the theme." Placenta **30 Suppl A**: S32-7.
- Roberts, J. M. et Redman, C. W. (1993). "Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension." Lancet **341**(8858): 1447-51.
- Roberts, J. M., Taylor, R. N., Musci, T. J., Rodgers, G. M., Hubel, C. A. et McLaughlin, M. K. (1989). "Preeclampsia: an endothelial cell disorder." Am J Obstet Gynecol **161**(5): 1200-4.
- Roberts, R. (1998). "Hypertension in women with gestational diabetes." Diabetes Care **21 Suppl 2**: B27-32.
- Robillard, P. Y., Dekker, G. A. et Hulsey, T. C. (1999). "Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity?" Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **84**(1): 37-41.
- Robillard, P. Y. et Hulsey, T. C. (1996). "Association of pregnancy-induced-hypertension, pre-eclampsia, and eclampsia with duration of sexual cohabitation before conception." Lancet **347**(9001): 619.
- Robillard, P. Y., Hulsey, T. C., Perianin, J., Janky, E., Miri, E. H. et Papiernik, E. (1994). "Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception." Lancet **344**(8928): 973-5.
- Rockwell, L. C., Vargas, E. et Moore, L. G. (2003). "Human physiological adaptation to pregnancy: inter- and intraspecific perspectives." Am J Hum Biol **15**(3): 330-41.
- Rossmann, W. G., Wolfahrt, S., Ecker, A. et Eberhardt, E. (1997). "The demonstration of progesterone, but not of estrogen, receptors in the developing human placenta." Horm Metab Res **29**(12): 604-10.
- Rumbold, A. R., Crowther, C. A., Haslam, R. R., Dekker, G. A. et Robinson, J. S. (2006). "Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications." N Engl J Med **354**(17): 1796-806.
- Salafia, C. M., Pezzullo, J. C., Lopez-Zeno, J. A., Simmens, S., Minior, V. K. et Vintzileos, A. M. (1995). "Placental pathologic features of preterm preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **173**(4): 1097-105.
- Salha, O., Sharma, V., Dada, T., Nugent, D., Rutherford, A. J., Tomlinson, A. J., Philips, S., Allgar, V. et Walker, J. J. (1999). "The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy." Hum Reprod **14**(9): 2268-73.
- Salle, B. L., Senterre, J., Glorieux, F. H., Delvin, E. E. et Putet, G. (1987). "Vitamin D metabolism in preterm infants." Biol Neonate **52**: 119-30.

- Schoeber, J. P., Hoenderop, J. G. et Bindels, R. J. (2007). "Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6." Biochem Soc Trans **35**(Pt 1): 115-9.
- Scott, J. R. (2003). "Magnesium sulfate for mild preeclampsia." Obstet Gynecol **101**(2): 213.
- Seely, E. W. (2007). "Calcitropic hormones in preeclampsia: a renewal of interest." J Clin Endocrinol Metab **92**(9): 3402-3.
- Senior, P. V., Heath, D. A. et Beck, F. (1991). "Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA in the rat before birth: demonstration by hybridization histochemistry." J Mol Endocrinol **6**(3): 281-90.
- Shaamash, A. H., Elsonosy, E. D., Zakhari, M. M., Radwan, S. H. et El-Dien, H. M. (2001). "Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia." Int J Gynaecol Obstet **72**(2): 127-33.
- Sibai, B., Dekker, G. et Kupferminc, M. (2005). "Pre-eclampsia." Lancet **365**(9461): 785-99.
- Sibai, B. M. (2002). "Chronic hypertension in pregnancy." Obstet Gynecol **100**(2): 369-77.
- Sibai, B. M., Hauth, J., Caritis, S., Lindheimer, M. D., MacPherson, C., Klebanoff, M., VanDorsten, J. P., Landon, M., Miodovnik, M., Paul, R., Meis, P., Thurnau, G., Dombrowski, M., Roberts, J. et McNellis, D. (2000). "Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units." Am J Obstet Gynecol **182**(4): 938-42.
- Sibai, B. M. et Stella, C. L. (2009). "Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia." Am J Obstet Gynecol **200**(5): 481 e1-7.
- Skjaerven, R., Wilcox, A. J. et Lie, R. T. (2002). "The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia." N Engl J Med **346**(1): 33-8.
- Skoczylas-Pietrzyk, M., Stryjecka-Zimmer, M. et Oleszczuk, J. (1998). "[Lipid and protein peroxidation process and catalase activity in pre-eclamptic placenta]." Ginek Pol **69**(12): 902-8.
- Somlyo, A. P. et Somlyo, A. V. (2000). "Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II." J Physiol **522 Pt 2**: 177-85.
- Sorensen, T. K., Williams, M. A., Lee, I. M., Dashow, E. E., Thompson, M. L. et Luthy, D. A. (2003). "Recreational physical activity during pregnancy and risk of preeclampsia." Hypertension **41**(6): 1273-80.
- Speroni, F., Rebolledo, A., Salemme, S., Roldan-Palomo, R., Rimorini, L., Anon, M. C., Spinillo, A., Tanzi, F. et Milesi, V. (2009). "Genistein effects on Ca²⁺ handling in human umbilical artery: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and of voltage-operated Ca²⁺ channels." J Physiol Biochem **65**(2): 113-24.
- Stanek, J., Eis, A. L. et Myatt, L. (2001). "Nitrotyrosine immunostaining correlates with increased extracellular matrix: evidence of postplacental hypoxia." Placenta **22 Suppl A**: S56-62.
- Steinert, J. R., Wyatt, A. W., Jacob, R. et Mann, G. E. (2009). "Redox modulation of Ca²⁺ signaling in human endothelial and smooth muscle cells in pre-eclampsia." Antioxid Redox Signal.
- Strehler, E. E. et Treiman, M. (2004). "Calcium pumps of plasma membrane and cell interior." Curr Mol Med **4**(3): 323-35.

- Strickland, S. et Richards, W. G. (1992). "Invasion of the trophoblasts." *Cell* **71**(3): 355-7.
- Thaler, I., Manor, D., Itskovitz, J., Rottem, S., Levit, N., Timor-Tritsch, I. et Brandes, J. M. (1990). "Changes in uterine blood flow during human pregnancy." *Am J Obstet Gynecol* **162**(1): 121-5.
- Tranquilli, A. L. et Landi, B. "The origin of pre-eclampsia: from decidual "hyperoxia" to late hypoxia." *Med Hypotheses* **75**(1): 38-46.
- Trudinger, B. J., Giles, W. B., Cook, C. M., Bombardieri, J. et Collins, L. (1985). "Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: clinical significance." *Br J Obstet Gynaecol* **92**(1): 23-30.
- Trudinger, B. J. et Ishikawa, K. (1990). "Use of Doppler ultrasound in the high-risk pregnancy." *Clin Diagn Ultrasound* **26**: 119-37.
- Trupin, L. S., Simon, L. P. et Eskenazi, B. (1996). "Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas." *Epidemiology* **7**(3): 240-4.
- Tsyvian, P. B., Markova, T. V., Mikhailova, S. V., Hop, W. C. et Wladimiroff, J. W. (2008). "Left ventricular isovolumic relaxation and renin-angiotensin system in the growth restricted fetus." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **140**(1): 33-7.
- Vargas, A., Moreau, J., Le Bellego, F., Lafond, J. et Barbeau, B. (2008). "Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor." *Placenta* **29**(2): 170-4.
- Villar, J. et Repke, J. T. (1990). "Calcium supplementation during pregnancy may reduce preterm delivery in high-risk populations." *Am J Obstet Gynecol* **163**(4 Pt 1): 1124-31.
- von Dadelszen, P., Magee, L. A. et Roberts, J. M. (2003). "Subclassification of preeclampsia." *Hypertens Pregnancy* **22**(2): 143-8.
- Wagner, L. K. (2004). "Diagnosis and management of preeclampsia." *Am Fam Physician* **70**(12): 2317-24.
- Walsh, S. W. (2007). "Obesity: a risk factor for preeclampsia." *Trends Endocrinol Metab* **18**(10): 365-70.
- Walsh, S. W., Vaughan, J. E., Wang, Y. et Roberts, L. J., 2nd (2000). "Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia." *FASEB J* **14**(10): 1289-96.
- Wang, J. X., Knottnerus, A. M., Schuit, G., Norman, R. J., Chan, A. et Dekker, G. A. (2002). "Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia." *Lancet* **359**(9307): 673-4.
- Waring, P. (2005). "Redox active calcium ion channels and cell death." *Arch Biochem Biophys* **434**(1): 33-42.
- Wasserman, R. H. et Fullmer, C. S. (1989). "On the molecular mechanism of intestinal calcium transport." *Adv Exp Med Biol* **249**: 45-65.
- Weber, K., Erben, R. G., Rump, A. et Adamski, J. (2001). "Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECAC1 and 2." *Biochem Biophys Res Commun* **289**(5): 1287-94.
- Wen, S. W., Demissie, K., Yang, Q. et Walker, M. C. (2004). "Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies." *Am J Obstet Gynecol* **191**(1): 254-8.
- Wiktor, H. et Kankofer, M. (1998). "Superoxide dismutase activity in normal and preeclamptic placentas." *Ginekolog Pol* **69**(12): 915-8.

- Wimalasundera, R. C., Thom, S. A., Regan, L. et Hughes, A. D. (2005). "Effects of vasoactive agents on intracellular calcium and force in myometrial and subcutaneous resistance arteries isolated from preeclamptic, pregnant, and nonpregnant woman." Am J Obstet Gynecol **192**(2): 625-32.
- Wimalasundera, R. C., Wijetunge, S., Thom, S. M., Regan, L. et Hughes, A. D. "Impaired recovery of intracellular calcium and force after activation in isolated myometrial and subcutaneous resistance arteries from women with preeclampsia." J Hypertens **28**(3): 568-74.
- Witlin, A. G. et Sibai, B. M. (1998). "Magnesium sulfate therapy in preeclampsia and eclampsia." Obstet Gynecol **92**(5): 883-9.
- Yeo, S., Davidge, S., Ronis, D. L., Antonakos, C. L., Hayashi, R. et O'Leary, S. (2008). "A comparison of walking versus stretching exercises to reduce the incidence of preeclampsia: a randomized clinical trial." Hypertens Pregnancy **27**(2): 113-30.
- Yeo, S. et Davidge, S. T. (2001). "Possible beneficial effect of exercise, by reducing oxidative stress, on the incidence of preeclampsia." J Womens Health Gend Based Med **10**(10): 983-9.
- Yung, H. W., Calabrese, S., Hynx, D., Hemmings, B. A., Cetin, I., Charnock-Jones, D. S. et Burton, G. J. (2008). "Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction." Am J Pathol **173**(2): 451-62.
- Zhang, K. et Kaufman, R. J. (2008). "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response." Nature **454**(7203): 455-62.
- Zhou, Y., Damsky, C. H., Chiu, K., Roberts, J. M. et Fisher, S. J. (1993). "Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts." J Clin Invest **91**(3): 950-60.
- Zhou, Y., Damsky, C. H. et Fisher, S. J. (1997). "Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?" J Clin Invest **99**(9): 2152-64.
- Zusterzeel, P. L., Rutten, H., Roelofs, H. M., Peters, W. H. et Steegers, E. A. (2001). "Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress." Placenta **22**(2-3): 213-9.

APPENDICE A

